

**Molekularbiologische und biochemische
Untersuchungen zur Biosynthese von Ergotalkaloiden
in Pilzen der Familien Trichocomaceae und Arthrodermataceae**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Christiane Wallwey
aus Dortmund**

Marburg/Lahn, 2012

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am 25. Mai 2012.

Erstgutachter: Prof. Dr. Shu-Ming Li
Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Keusgen

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Mai 2012

Publikationen und Präsentationen	IV
Abkürzungen	VI
Zusammenfassung	1
Summary	4
1 Einleitung	5
1.1 Die Geschichte der Ergotalkaloide	5
1.2 Einteilung der Ergotalkaloide und ihre pharmazeutische Wirkung.....	6
1.2.1 Alkaloide vom Clavin-Typ.....	7
1.2.2 D-Lysergsäureamide: Ergoamide.....	9
1.2.3 D-Lysergsäurepeptide: Ergopeptine.....	9
1.2.4 Substanzen mit ergotalkaloidähnlichen Strukturen	11
1.3 Produzenten von Ergotalkaloiden.....	12
1.3.1 Produzenten von Alkaloiden des Clavin-Typs	12
1.3.2 Produzenten von Ergoamiden und Ergopeptinen.....	13
1.4 Gencluster für die Ergotalkaloidbiosynthese	14
1.4.1 Identifizierung der Gencluster in den Produzenten	14
1.4.2 Der Zusammenhang zwischen den Informationen in den Genclustern und den Strukturmerkmalen der Ergotalkaloide	16
1.5 Stand der Biosynthese von Ergotalkaloiden zu Beginn der Promotion.....	18
1.5.1 Die Bildung des tetrazyklischen Ergolinringsystems	18
1.5.2 Die Biosynthese von Fumigaclavinen	21
2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	22
3 Material und Methoden.....	24
3.1 Chemikalien, Säulenmaterialien und Enzyme	24
3.1.1 Chemikalien	24
3.1.2 Materialien zur Chromatographie	24
3.1.3 Enzyme und Kits	25
3.2 Nährmedien und Puffer	25
3.2.1 Nährmedien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	25
3.2.2 Antibiotika.....	26
3.2.3 Puffer und Lösungen	26
3.3 Plasmide, Primer, Bakterienstämme.....	29
3.3.1 Plasmide	29
3.3.2 Primer.....	31
3.3.3 Bakterienstämme	32
3.4 Methoden der Molekularbiologie	33
3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
3.4.2 Agarosegel-Elektrophorese.....	36
3.4.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	36

3.4.4	Restriktion von DNA.....	36
3.4.5	Ligation von DNA-Fragmenten.....	37
3.4.6	CaCl ₂ -vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	37
3.4.7	Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> (Alkalische Lyse).....	38
3.5	Methoden der Biochemie.....	39
3.5.1	Heterologe Expression von Genen in <i>E. coli</i>	39
3.5.2	Reinigung von Hexahistidin-Fusionsproteinen mittels Nickel-Affinitäts- chromatographie.....	39
3.5.3	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung	40
3.5.4	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	40
3.5.5	Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen mittels Größen- ausschlusschromatographie	41
3.5.6	Enzymatische Reaktionsansätze	41
3.6	Isolierung von Sekundärstoffen aus Ascomyceten	46
3.6.1	Extraktion der Kulturüberstände von <i>Arthroderma benhamiae</i>	46
3.6.2	Isolierung von (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i>)-Fumigaclavin A	46
3.7	Instrumentelle Analytik niedermolekularer Substanzen	47
3.7.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	47
3.7.2	Dünnschichtchromatographie (DC)	48
3.7.3	Massenspektrometrie (MS)	48
3.7.4	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	49
4	Ergebnisse	50
4.1	Untersuchungen zur Ergotalkaloidbiosynthese in Pilzen der Familie Trichocomaceae.....	50
4.1.1	Charakterisierung der Chanoclavin-I-Dehydrogenase FgaDH aus <i>Aspergillus fumigatus</i>	50
4.1.2	Charakterisierung des <i>Old Yellow Enzyme</i> FgaOx3 aus <i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i>	59
4.1.3	Charakterisierung der Festuclavin-Synthase FgaFS aus <i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i>	69
4.2	Versuche zur Prenylierung verschiedener Ergotalkaloide durch FgaPT1 aus <i>Aspergillus fumigatus</i>	78
4.2.1	Die Prenyltransferase FgaPT1	78
4.2.2	Optimierung der Expressionsbedingungen von <i>fgaPT1</i>	79
4.2.3	Aktivitätstest mit His ₆ -FgaPT1 und neuen Substraten.....	81
4.2.4	Isolierung von (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i>)-Fumigaclavin A aus Extrakten von <i>Penicillium</i> <i>commune</i> NRRL 2033.....	83

4.3	Untersuchungen zur Ergotalkaloidbiosynthese in Pilzen der Familie Arthrodermataceae.....	87
4.3.1	Identifikation eines putativen Genclusters für die Biosynthese von Ergotalkaloiden in Pilzen der Familie Arthrodermataceae.....	87
4.3.2	Charakterisierung der Chanoclavin-I-Dehydrogenase ChaDH aus <i>Arthroderma benhamiae</i>	93
4.3.3	Untersuchung der Gene in Nachbarschaft zu den fünf homologen Genen aus <i>Arthroderma benhamiae</i>	105
5	Diskussion.....	116
5.1	Die Biosynthese von Ergotalkaloiden in <i>Aspergillus fumigatus</i>	116
5.1.1	Die Chanoclavin-I-Dehydrogenase FgaDH	116
5.1.2	Die durch FgaOx3 und FgaFS katalysierte Bildung von Festuclavin.....	117
5.1.3	Fortschritte in der Aufklärung des Biosynthesewegs von (8S,9S)- Fumigaclavin C in <i>Aspergillus fumigatus</i>	120
5.1.4	Die Substratspezifität der Prenyltransferase FgaPT1	122
5.2	Ein putatives Ergotalkaloidgencluster in Pilzen der Familie Arthrodermataceae.....	123
6	Referenzen.....	126
7	Anhang.....	136
7.1	MS- und NMR-Spektren der isolierten Substanzen aus der FgaDH- Reaktion	136
7.2	MS- und NMR-Spektren der isolierten Substanzen aus der FgaOx3- Reaktion	139
7.3	MS- und NMR-Spektren der isolierten Substanz aus der FgaFS- Reaktion	149
7.4	¹ H-NMR-Spektrum von dem isolierten (8R,9S)-Fumigaclavin A.....	158
7.5	MS- und NMR-Spektren der isolierten Substanzen aus der ChaDH- Reaktion	159
	Danksagung	167
	Curriculum vitae.....	168

Publikationen

1. **Christiane Wallwey**, Christoph Heddergott, Xiulan Xie, Axel A. Brakhage and Shu-Ming Li (2012), Genome mining reveals the presence of a conserved gene cluster for the biosynthesis of ergot alkaloid precursors in the fungal family Arthrodermataceae, Microbiology, DOI:10.1099/mic.0.056796-0 (Originalarbeit)
2. **Christiane Wallwey** and Shu-Ming Li, Production, detection and purification of clavine-type alkaloids, Methods in Molecular Biology, Editors: Nancy Keller and Geoffrey Turner, Humana Press, in Druck (Buchkapitel)
3. **Christiane Wallwey** and Shu-Ming Li (2011), Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes, Natural Product Reports **28**, 496-510 (Review)
4. **Christiane Wallwey**, Marco Matuschek, Xiulan Xie and Shu-Ming Li (2010), Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: Conversion of chanoclavine-I aldehyde to festuclavine by the festuclavine synthase FgaFS in the presence of the old yellow enzyme FgaOx3, Organic and Biomolecular Chemistry **8**, 3500-3508 (Originalarbeit)
5. **Christiane Wallwey**, Marco Matuschek and Shu-Ming Li (2010), Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: conversion of chanoclavine-I to chanoclavine-I aldehyde catalyzed by a short-chain alcohol dehydrogenase FgaDH, Archives of Microbiology **192**(2), 127-134 (Originalarbeit)
6. Marco Matuschek, **Christiane Wallwey**, Beate Wollinsky, Xiulan Xie and Shu-Ming Li (2012), *In vitro* conversion of chanoclavine-I aldehyde to the stereoisomers festuclavine and pyroclavine was controlled by the second reduction step, RSC Advances, DOI:10.1039/C2RA20104F (Originalarbeit)
7. Xiulan Xie, **Christiane Wallwey**, Marco Matuschek, Klaus Steinbach and Shu-Ming Li (2011), Formyl migration product of chanoclavine-I aldehyde in the presence of the old yellow enzyme FgaOx3 from *Aspergillus fumigatus*: a NMR structure elucidation, Magnetic Resonance in Chemistry **49**(10), 678–681 (Originalarbeit)

8. Marco Matuschek, **Christiane Wallwey**, Xiulan Xie and Shu-Ming Li (2011), New insights into ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps purpurea*: An agroclavine synthase EasG catalyses, *via* a non-enzymatic intermediate with reduced glutathione, the conversion of chanoclavine-I aldehyde to agroclavine, Organic and Biomolecular Chemistry **9**, 4328-4335 (Originalarbeit)

Präsentationen bei Tagungen

Christiane Wallwey, Christoph Heddergott, Xiulan Xie, Axel A. Brakhage and Shu-Ming Li

A putative ergot alkaloid gene cluster in the fungal family of Arthrodermataceae

Posterpräsentation, Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 18.-21. März 2012, Tübingen

Christiane Wallwey, Marco Matuschek and Shu-Ming Li

Ergot alkaloid biosynthesis in Ascomycetes: Chanoclavine-I aldehyde is the branch point of different pathways

Posterpräsentation und Vortrag, 23. Irseer Naturstofftage (Dechema), 23.-25. Februar 2011, Kloster Irsee

Abkürzungen

A	Adenin
<i>A.b.</i>	<i>Arthroderma benhamiae</i>
<i>A.f.</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. benhamiae</i>	<i>Arthroderma benhamiae</i>
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. gypseum</i>	<i>Arthorderma gypseum</i>
<i>A. otae</i>	<i>Arthorderma otae</i>
AS	Aminosäure(n)
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
bidest.	bidestilliert
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
brs	breites Singulett
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
c	Konzentration
C	Cytosin
<i>C. fusiformis</i>	<i>Claviceps fusiformis</i>
<i>C. hirtella</i>	<i>Claviceps hirtella</i>
<i>C.p.</i>	<i>Claviceps purpurea</i>
<i>C. paspali</i>	<i>Claviceps paspali</i>
<i>C. purpurea</i>	<i>Claviceps purpurea</i>
Cam ^R	Chloramphenicol-Resistenz
Carb	Carbenicillin
cDNA	komplementäre DNA
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Duplett
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Duplett vom Duplett
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMAT	Dimethylallyltryptophan
DMATS	Dimethylallyltryptophansynthase
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)

DNase	Deoxyribonuclease (Desoxyribonuklease)
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
dt	Duplett vom Triplett
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-COSY	Exclusive COSY
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
ESI	Elektrospray Ionisation
FAD	Flavinadenindinukleotid (oxidiert)
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	Fast protein liquid chromatography
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
His ₆	Hexahistidin
His ₈	Octahistidin
HCl	Salzsäure
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation
Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalactopyranosid
J	Kopplungskonstante
k_{cat}	Wechselzahl
Km ^R	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
<i>lacZ</i>	β-Galaktosidase-Gen
LB	Lysogeny broth
M	molar
m	Multipllett
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
NAD ⁺ /NADH	Nikotinamidadenindinucleotid (oxidierte/reduzierte Form)
NADP ⁺ /NADPH	Nikotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidierte/reduzierte Form)
NaOH	Natriumhydroxid

Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat
Nm	Nanometer
NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernresonanz-Spektroskopie)
NOESY	homonuclear two-dimensional nuclear Overhauser effect spectroscopy
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetase
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame (Offener Leserahmen)
OYE	Old Yellow Enzyme
<i>P. commune</i>	<i>Penicillium commune</i>
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PP _i	Pyrophosphat
ppm	parts per million
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuclease (Ribonuklease)
RP	reversed phase
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Singulett
s.	siehe
SDR	Short-Chain Dehydrogenase/Reduktase
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
t	Triplett
T	Thymin
<i>T. equinum</i>	<i>Trichophyton equinum</i>
<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
<i>T. tonsurans</i>	<i>Trichophyton tonsurans</i>
<i>T. v.</i>	<i>Trichophyton verrucosum</i>
<i>T. verrucosum</i>	<i>Trichophyton verrucosum</i>
t _R	Retentionszeit
td	Triplett vom Duplett
TB	Terrific Broth
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoroacetic acid (Trifluoressigsäure)
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U	Unit
UV	ultraviolett
v/v	volume per volume
V	Volt

v_{\max}	Maximalgeschwindigkeit
Vol.	Volumenteile
w/v	weight per volume
$x\ g$	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Ergotalkaloide sind eine komplexe Familie von Indolderivaten mit einem tetrazyklischen Ergolinringsystem, die von Pilzen aus zwei unterschiedlichen Familien produziert werden. Dies sind beispielsweise *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) aus der Familie Trichocomaceae oder *Claviceps purpurea* (*C. purpurea*) aus der Familie Clavicipitaceae. Ergotalkaloide besitzen unterschiedliche Strukturen und dadurch auch unterschiedliche biologische Aktivitäten. Aufgrund ihrer Strukturen können Ergotalkaloide in drei Gruppen eingeteilt werden: Alkaloide vom Clavin-Typ, Ergoamide und Ergopeptine. Ergoamide sind Amid-Derivate der D-Lysergsäure, während Ergopeptine Peptid-Derivate der D-Lysergsäure darstellen. Alkaloide vom Clavin-Typ enthalten zwar das tetrazyklische Ergolinringsystem, sind jedoch keine Derivate der D-Lysergsäure. Ein Beispiel für diese Gruppe ist Fumigaclavin C, das Endprodukt der Ergotalkaloidbiosynthese in *A. fumigatus*. Die Pilze der Familie Trichocomaceae produzieren nur Alkaloide vom Clavin-Typ, während Pilze der Familie Clavicipitaceae hauptsächlich Ergoamide und Ergopeptine bilden. Durch den Vergleich der Gencluster für die Biosynthese von Ergotalkaloiden verschiedener Produzenten konnten sieben homologe Gene identifiziert werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese Gene in die Bildung des tetrazyklischen Ergolinringsystems involviert sein müssen.

In früheren Studien konnten zwei der sieben homologen Gene, *fgaPT2* und *fgaMT* aus *A. fumigatus*, den entsprechenden Schritten in der Biosynthese des Ergolinrings zugeordnet werden. Die Prenyltransferase FgaPT2 katalysiert den ersten Schritt, die Prenylierung von L-Tryptophan. Das Produkt, 4-Dimethylallyltryptophan (4-DMAT), wird im nächsten Schritt durch die N-Methyltransferase FgaMT zu N-Methyl-4-Dimethylallyltryptophan (4-DMA-L-Abrin) umgesetzt.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten die Funktionen von drei weiteren der sieben homologen Gene aus *A. fumigatus*, *fgaDH*, *fgaOx3* und *fgaFS*, in der Biosynthese von Fumigaclavin C aufgeklärt werden. FgaDH besitzt die konservierten Motive von klassischen Short-Chain Dehydrogenasen/Reduktasen (SDRs), weist aber ansonsten keine Sequenzähnlichkeiten zu SDRs oder anderen bekannten Proteinen auf. Es konnte gezeigt werden, dass FgaDH die Oxidation von Chanoclavin-I zu Chanoclavin-I-Aldehyd katalysiert, wobei NAD^+ als Kofaktor benötigt wird. Die Struktur von Chanoclavin-I-Aldehyd konnte eindeutig durch NMR- und MS-Analysen nachgewiesen werden. Die K_M -Werte für Chanoclavin-I und NAD^+ betrugen 0,27 bzw. 1,1 mM. Eine Wechselzahl von $0,38 \text{ s}^{-1}$ wurde aus den kinetischen Parametern berechnet.

Das Protein FgaOx3 enthält eine *old yellow enzyme-like FMN binding domain*, während FgaFS keine konservierten Bereiche oder sonstige Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen aufweist. Die beiden Proteine FgaOx3 und FgaFS sind zusammen für die Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin verantwortlich. In Abwesenheit von FgaFS kommt es durch FgaOx3 unter Einbau von Sauerstoff zur Bildung eines Produktgemischs, das aus zwei Stereoisomeren besteht und durch FgaFS nicht weiter umgesetzt wird. Die Strukturen von Festuclavin und den zwei Stereoisomeren konnten durch detaillierte NMR- und MS-Analysen aufgeklärt werden. Anhand der gesammelten Daten wurde ein Reaktionsmechanismus ausgehend von Chanoclavin-I-Aldehyd postuliert.

Desweiteren konnte in dieser Dissertation durch eine Analyse der Genomsequenzen verschiedener Pilze ein putatives Ergotalkaloidgencluster in den Pilzen der Familie *Arthrodermataceae* identifiziert werden. Das Cluster besteht aus fünf Genen, deren Homologe in *A. fumigatus* und *C. purpurea* in die Bildung von Chanoclavin-I-Aldehyd aus L-Tryptophan involviert sind. Es konnten keine homologen Gene zu denen gefunden werden, die für die weitere Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin bzw. Agroclavin oder für die späteren Schritte im Biosyntheseweg von *A. fumigatus* bzw. *C. purpurea* verantwortlich sind.

Aus dem putativen Gencluster von *Arthroderma benhamiae* (*A. benhamiae*) wurde das Gen *ARB_04646*, welches das Homolog zu *fgaDH* ist, mit korrigierter Intron/Exon-Struktur amplifiziert, kloniert und erfolgreich exprimiert. Das Enzym bekam die Bezeichnung ChaDH. ChaDH katalysiert wie sein Homolog FgaDH in Anwesenheit von NAD^+ die Oxidation von Chanoclavin-I. Das enzymatische Produkt konnte durch NMR- und MS-Analysen eindeutig als Chanoclavin-I-Aldehyd identifiziert werden. Die K_M -Werte für Chanoclavin-I und NAD^+ betrugen 0,09 bzw. 0,36 mM. Aus den kinetischen Parametern wurde eine Wechselzahl von $0,76 \text{ s}^{-1}$ berechnet. In den Kulturüberständen von *A. benhamiae* konnten keine Ergotalkaloide nachgewiesen werden. Die Expressionsanalyse der Gene zeigte, dass unter den gewählten Laborbedingungen keine detektierbare Expression stattfand.

In dieser Arbeit konnte somit eine dritte pilzliche Familie identifiziert werden, die zumindest die genetischen Informationen für die Biosynthese von Ergotalkaloiden bzw. Chanoclavin-I-Aldehyd enthält.

Summary

Ergot alkaloids are a complex family of indol derivatives with the typical tetracyclic ergoline ringsystem, which are produced by fungi of two different families, e.g. *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*), from the family Trichocomaceae, and *Claviceps purpurea* (*C. purpurea*), from the family Clavicipitaceae. Ergot alkaloids exhibit different structures and therefore diverse biological activities. Based on the structures ergot alkaloids can be divided into three groups: clavine-type alkaloids, ergoamides and ergopeptines. Ergoamides and ergopeptines are amide and peptide derivatives of D-lysergic acid, respectively. Clavin-Type alkaloids consist merely of the ergoline ringsystem and are no D-lysergic acid derivatives. An example for a clavine-type alkaloid is fumigaclavine C, the end product of the ergot alkaloid biosynthetic pathway in *A. fumigatus*. Fungi of the family Trichocomaceae are producers of clavine-type alkaloids, whereas some members of the family Clavicipitaceae produce mainly ergoamides and ergopeptines. The comparison of the biosynthetic gene clusters of different ergot alkaloid producers led to identification of seven homologous genes. It was speculated that these genes are involved in the formation of the tetracyclic ergoline ring system.

In previous studies, two of the seven homologous genes, *fgaPT2* and *fgaMT* of *A. fumigatus*, were assigned to the corresponding step in the biosynthesis of the ergoline ring. The gene *fgaPT2* encodes a prenyltransferase, which catalyzes the first step in the biosynthesis, i.e. prenylation of L-tryptophan. The product 4-dimethylallyltryptophan (4-DMAT) of this reaction is then methylated by *N*-methyltransferase FgaMT, resulting in the formation of *N*-methyl-4-dimethylallyltryptophan (4-DMA-L-abrine).

In this thesis, functions of three additional genes, *fgaDH*, *fgaOx3* and *fgaFS* of *A. fumigatus*, were proven biochemically. FgaDH contains the conserved motifs of classical short-chain dehydrogenases (SDRs), but shows otherwise no significant sequence similarity to SDRs or other known proteins. It was shown that FgaDH catalyses the oxidation of chanoclavine-I to chanoclavine-I aldehyde in the presence of NAD^+ . The structure of chanoclavine-I aldehyde was unequivocally elucidated by NMR and MS analysis. The K_M value was determined as 0.27 mM for chanoclavine-I and 1.1 mM for NAD^+ , respectively. The turnover number was determined as 0.38 s^{-1} .

The protein FgaOx3 contains an old yellow enzyme-like FMN binding domain, whereas FgaFS has no conserved regions or similarity to known proteins. FgaOx3 and FgaFS together are responsible for the formation of festuclavine from chanoclavine-I aldehyde. In the absence of FgaFS a mixture of two stereoisomers is

generated by FgaOx3 under consumption of oxygen. The isomers could not be further converted by FgaFS. The structures of these two stereoisomers as well as that of festuclavine were unequivocally elucidated by 1D- and 2D-NMR and MS analysis. On the basis of the obtained data, a reaction mechanism with chanoclavine-I aldehyde as substrate was postulated.

Furthermore, a putative ergot alkaloid gene cluster was identified in fungi of the family Arthrodermataceae by analysis of genome sequences. The cluster contains five genes whose enzymes have homology to the enzymes, which are involved in the formation of chanoclavine-I aldehyde from L-tryptophan in *A. fumigatus* and *C. purpurea*. Homologues neither to the genes responsible for the conversion of chanoclavine-I aldehyde to festuclavine or agroclavine nor to the genes involved in the later steps of ergot alkaloid biosyntheses in *A. fumigatus* and *C. purpurea* exist in the genomes of these fungi.

The *fgaDH* homologue from the putative ergot alkaloid cluster, *ARB_04646*, was amplified from gDNA of *Arthroderma benhamiae* (*A. benhamiae*), cloned and expressed in *E. coli*. The enzyme named ChaDH catalyses also the oxidation of chanoclavine-I in presence of NAD^+ . The enzymatic product was identified as chanoclavine-I aldehyde by NMR and MS analysis. The K_M values were determined as 0.09 mM for chanoclavine-I and 0.36 mM for NAD^+ , respectively. The turnover number was found to be 0.76 s^{-1} .

Thus a third fungal family was identified in this thesis, which has at least the genetic information for the biosyntheses of ergot alkaloids or their precursors, *i.e.* chanoclavine-I aldehyde. But no ergot alkaloids were detectable in the supernatant of *A. benhamiae* cultures and the analysis of the expression of the five cluster genes by Northern blot showed no detectable expression under the used conditions.

1 Einleitung

1.1 Die Geschichte der Ergotalkaloide

Ergotalkaloide sind eine komplexe Familie von Indolderivaten mit unterschiedlichen Strukturen und biologischen Aktivitäten (Flieger *et al.*, 1997; Gröger & Floss 1998; Haarmann *et al.*, 2009; Schardl *et al.*, 2006). Sie spielen seit langer Zeit eine wichtige Rolle als Arzneimittel in der Medizin, z.B. zur Uteruskontraktion während der Geburt und zur Auslösung der Nachgeburt (siehe auch Kapitel 1.2). Dem gegenüber steht die Wirkung der Ergotalkaloide als natürliche Mykotoxine in der Geschichte der Menschheit (Lee 2009a; Lee 2009b). Die Toxine werden im Mutterkorn (Ergot) von Pilzen der Gattung *Claviceps* produziert, die Gräser und Getreide befallen. Die Aufnahme von Ergot-infiziertem Getreide, insbesondere von Roggen, durch Menschen führte vor allem im Mittelalter zu schwerwiegenden Epidemien in Europa, dem sogenannten St.-Antonius Feuer. Durch die gefäßverengende Wirkung der Ergotalkaloide kommt es zu Durchblutungsstörungen. Es wird zwischen *ergotismus convulsivus* mit Paranoia und Halluzinationen sowie *ergotismus gangraenosus* unterschieden, bei dem die Gliedmaßen infolge der Durchblutungsstörungen nekrotisch werden. Eine akute Vergiftung kann durch Durchblutungsstörungen in den Herzmuskeln zu einem Herzstillstand und damit zum Tode führen (Lee 2009a). Im 17. Jahrhundert wurde erkannt, dass es sich nicht um eine ansteckende Krankheit handelt, sondern eine Verbindung zwischen Ergotismus und der Aufnahme von Getreide besteht. Aber erst 1853 konnte durch Tulasne geklärt werden, dass es sich bei der schwarz-violetten und gebogenen „Frucht“ des Roggens nicht um ein sonderbar gestaltetes Roggenkorn, sondern um das Sklerotium (Dauerform) eines schmarotzenden Pilzes handelt (Haarmann *et al.*, 2009). Trotzdem kam es noch zu weiteren Ausbrüchen. In der heutigen Zeit wird das verwendete Getreide daher sorgfältig gereinigt und das produzierte Mehl strengen Kontrollen unterzogen, wodurch Vergiftungen so gut wie ausgeschlossen sind. Durch den Trend, sein Mehl oder Müsli daheim selber herzustellen, kommt es allerdings doch noch zu einzelnen Fällen von Vergiftungen. Auch die unkontrollierte Einnahme von ergotalkaloidhaltigen Medikamenten kann heutzutage zu Vergiftungssymptomen führen. Durch die Aufnahme von Ergot-infiziertem Gras kommt es ebenfalls noch zu Epidemien im Tierbestand (Haarmann *et al.*, 2009; Pedrosa & Griebler 2010).

1.2 Einteilung der Ergotalkaloide und ihre pharmazeutische Wirkung

Das für Ergotalkaloide charakteristische Strukturmerkmal ist das tetrazyklische Ergolinringsystem (1) (Flieger *et al.*, 1997). Ergotalkaloide können aufgrund ihrer Strukturen in 3 Gruppen unterteilt werden, die Alkaloide vom Clavin-Typ (Clavine), die Ergoamide und die Ergopeptine. Ergoamide sind Amid-Derivate der D-Lysergsäure, während Ergopeptine Peptid-Derivate der D-Lysergsäure darstellen. Alkaloide vom Clavin-Typ enthalten nur das tetrazyklische Ergolinringsystem und sind keine Derivate der D-Lysergsäure. Die Vorläufersubstanzen der Ergotalkaloide haben statt des tetrazyklischen Ringsystems eine trizyklische Struktur ohne Ring D, d.h. sie besitzen einen 6,7-seco-D-ring (Flieger *et al.*, 1997). Wichtige natürlich vorkommende Vorläufer sind Chanoclavine-I (2), seine zwei Isomere Chanoclavine-II (3) und Isochanoclavine-I (4), sowie Chanoclavine-I-Aldehyd (5) und 6,7-seco-Agroclavine (6) (Abbildung 1-1). Bis jetzt ist kaum etwas über die biologischen und pharmakologischen Aktivitäten dieser Vorläufersubstanzen bekannt (Cole & Schweikert 2003).

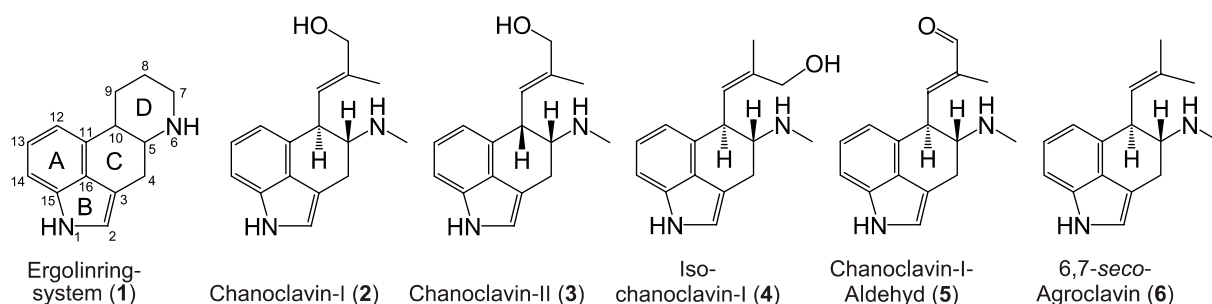


Abbildung 1-1: Strukturen der Ergotalkaloidvorläufermoleküle.

Die biologischen und pharmakologischen Aktivitäten der Ergotalkaloide mit Ergolinringsystem werden dagegen ausgiebig erforscht. Die Alkaloide vom Clavin-Typ, die Ergoamide und die Ergopeptine interagieren mit verschiedenen Rezeptoren des Zentralen Nervensystems (ZNS). Die Interaktionen basieren auf der Ähnlichkeit der Strukturen der Ergotalkaloide mit Serotonin (5-Hydroxytryptamin), Noradrenalin und Dopamin (Abbildung 1-2) (Katzug 2009). Manche Ergotalkaloide agieren als Agonisten, andere als Antagonisten an Dopaminrezeptoren (D_1 und D_2), Adrenozeptoren (α_1 und α_2) und Serotoninrezeptoren (5-HT) (Sinz 2008). Die Unterschiede in den physiochemischen, physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften werden beispielsweise bei Ergopeptinen und Ergoamiden durch die verschiedenen Substituenten an der Carboxylgruppe der D-Lysergsäure hervorgerufen (Haarmann *et al.*, 2009). In der modernen Medizin finden sowohl die

natürlichen als auch die semi-synthetischen Ergotalkaloide Anwendung. Aufgrund der Interaktionen mit den verschiedenen Rezeptoren des ZNS besitzen sie ein breites Spektrum an pharmakologischen Aktivitäten, u.a. eine uterotonische Wirkung, Regulierung des Blutdrucks, Kontrolle der Sekretion von hypophysären Hormonen, sowie dopaminerge und neuroleptische Aktivitäten (de Groot *et al.*, 1998; Haarmann *et al.*, 2009; Schardl *et al.*, 2006).

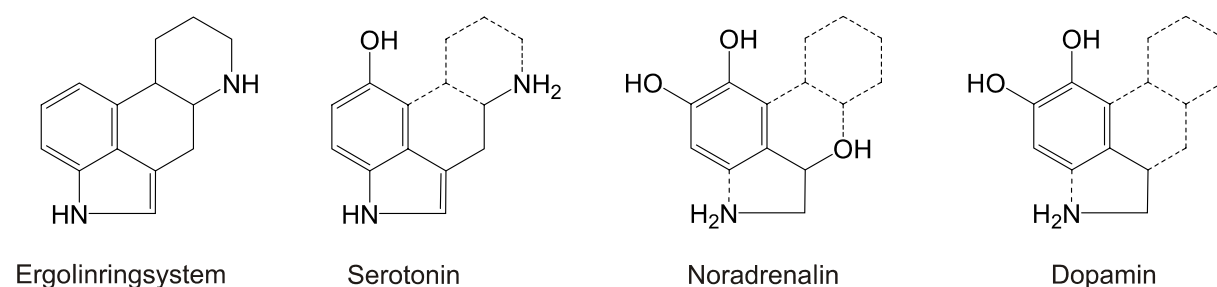


Abbildung 1-2: Die Strukturen von Serotonin, Noradrenalin und Dopamin im Vergleich mit dem tetrazyklischen Ergoliningsystem. Die gestrichelten Bindungen stellen imaginäre Bindungen dar.

1.2.1 Alkaloide vom Clavin-Typ

Alkaloide vom Clavin-Typ (Abbildung 1-3) wurden in verschiedenen Pilzstämmen identifiziert. Agroclavin (**7**) und Elymoclavin (**8**) besitzen eine Doppelbindung zwischen C-8 und C-9 des Rings D des Ergoliningsystems. Festuclavin (**9**) und Pyroclavin (**10**) haben stattdessen einen gesättigten Ring D und unterscheiden sich untereinander nur in ihrer Stereochemie an C-8. Ihre Stereoisomere Costaclavin (**11**) und Epicostaclavin (**12**) wurden ebenfalls in verschiedenen Pilzen identifiziert (Cole & Schweikert 2003). Die natürlich vorkommenden Clavine, wie z.B. **7-10**, agieren als volle Antagonisten oder partielle Agonisten am 5-HT_{2A} Rezeptor der Arterie eines Rattenschwanzes und als Antagonisten an α_1 -Adrenozeptoren der Rattenaorta (Pertz 1996).

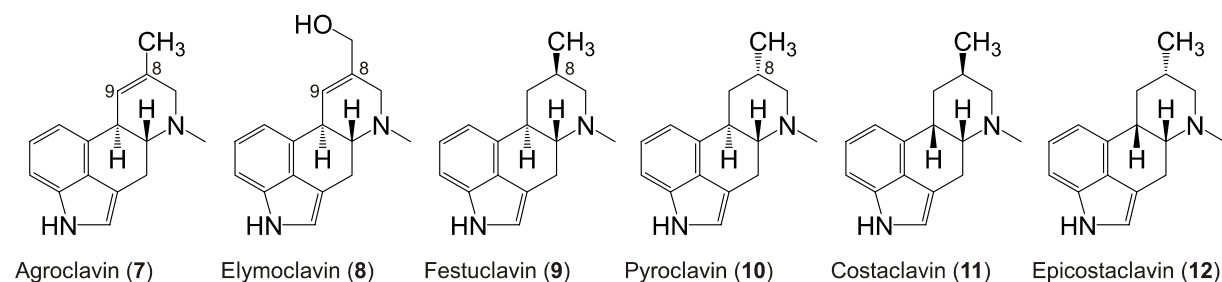


Abbildung 1-3: Strukturen einiger Alkaloide vom Clavin-Typ.

Im Vergleich zu Festuclavin und Pyroclavin besitzen die Substanzen Fumigaclavin A (**13**) und B (**14**) einen zusätzlichen Substituenten an C-9, d.h. eine Acetoxy- bzw. eine Hydroxygruppe, und Fumigaclavin C (**15**) noch zusätzlich zu der Acetoxygruppe einen reversen Prenylrest an C-2 (Abbildung 1-4). Verwirrung herrscht in der Literatur bei der Stereochemie der Fumigaclavine an C-8. Strukturen sowohl mit (8*S*,9*S*)- als auch (8*R*,9*S*)-Konfiguration wurden als Fumigaclavin A, B oder C bezeichnet (Cole *et al.*, 1977a; Flieger *et al.*, 1997; Frisvad *et al.*, 2009; Ge *et al.*, 2009; Kawai *et al.*, 1992; Ohmomo *et al.*, 1989; Zhao *et al.*, 2004). Die Diastereomere von Fumigaclavin A und B mit (8*S*,9*R*)-Konfiguration werden Isofumigaclavin A (**16**) und B (**17**) (Möller *et al.*, 1997) bzw. Roquefortin A und B (Cole *et al.*, 1983; O'Brien *et al.*, 2006) genannt. Bisher gab es keine Berichte über Isomere mit einer (8*R*,9*R*)-Konfiguration. Um in der Zukunft Verwirrung zu vermeiden, haben wir vorgeschlagen, die Namen Fumigaclavin A, B und C für alle Diastereomere zu verwenden und die Stereochemie an C-8 und C-9 durch Platzieren der Konfiguration vor den Namen zu definieren (Wallwey & Li 2011). Beispielsweise handelt es sich bei dem Fumigaclavin C, dass von Ge *et al.* 2009 aus dem *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*)-Stamm CY018 isoliert wurde, um (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin C (Ge *et al.*, 2009). Sie konnten außerdem zwei weitere Fumigaclavin C Derivate aus demselben Stamm isolieren, 9-Deacetoxyfumigaclavin C (**18**) und 9-Deacetylfumigaclavin C (**19**) mit (8*S*,9*S*)-Konfiguration (Ge *et al.*, 2009). Beide Substanzen zeigen selektive Zytotoxizität gegen humane Leukämiezellen.

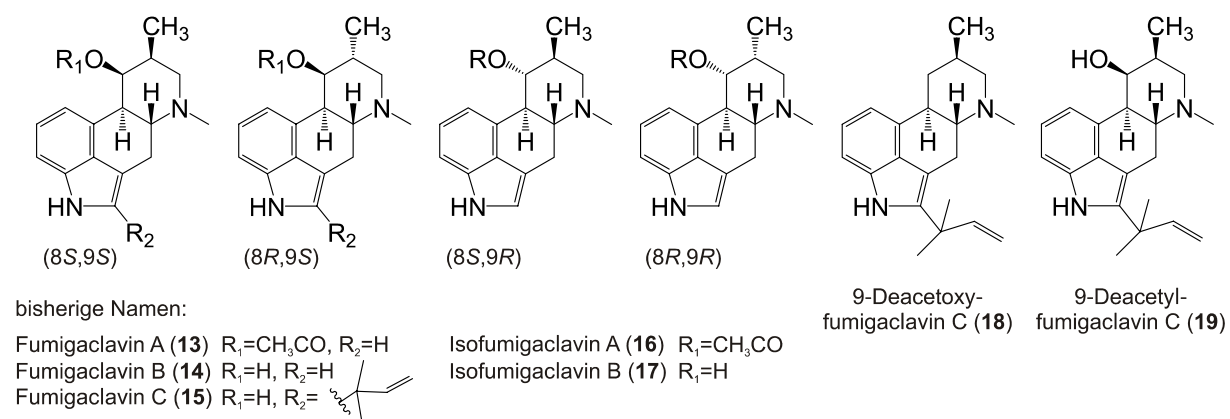


Abbildung 1-4: Strukturen von Fumigaclavinen und ihren Derivaten.

Die pharmazeutische Wirkung von Fumigaclavin C ist die Relaxation isolierter Aortenringe von Ratten. Aufgrund dieses vasorelaxierenden Effekts hat die Substanz das Potential zum Einsatz als Gefäßschutz (Ma *et al.*, 2006). Zusätzlich scheint Fumigaclavin C einen positiven Effekt auf Leberschäden und Dickdarmentzündungen (Kolitis) bei Tieren zu besitzen (Wu *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2004). Laut den Autoren

handelt es sich dabei jeweils um (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin C, obwohl das Alkaloid aus dem gleichen *A. fumigatus*-Stamm wie bei Ge *et al.* (2009) isoliert wurde.

1.2.2 D-Lysergsäureamide: Ergoamide

Ergoamide (Abbildung 1-5) sind Amide der D-Lysergsäure (**20**). Im Vergleich zu Agroclavin und Elymoclavin ist die Doppelbindung von C-8 und C-9 zu C-9 und C-10 verschoben. Das einfachste Ergoamid ist Ergin (**21**) mit einer Aminogruppe als Substituent an der D-Lysergsäure. Die wichtigsten Ergoamide sind das natürlich vorkommende Ergometrin (**22**) (auch Ergonovin oder Ergobasin genannt) (van Dongen & de Groot 1995) und sein semi-synthetisches Derivat Methylergometrin (**23**). Beide Substanzen besitzen als Substituent einen Aminoalkohol, der von Alanin abgeleitet ist. Bei Ergometrin ist der Substituent 2-Aminopropanol und bei Methylergometrin 2-Aminobutanol. Ergometrin und Methylergometrin haben einen uterotonischen Effekt und werden als Medikament für die Vorbeugung und Behandlung von schweren Blutungen nach der Geburt (Postpartale Hämorrhagie) sowie zur Förderung der Involution des Uterus verwendet (De Costa 2002; Rajan & Wing 2010). Das semi-synthetische Lysergsäurediethylamid (LSD) (**24**) greift partial-agonistisch am 5-HT_{2A}-Rezeptor an und wurde ursprünglich für die Behandlung von verschiedenen psychiatrischen Beschwerden entwickelt (Lee 2010). Aufgrund seiner halluzinogenen Effekte wird es heutzutage aber als illegale, bewusstseinsverändernde Droge benutzt (Hofmann 1980).

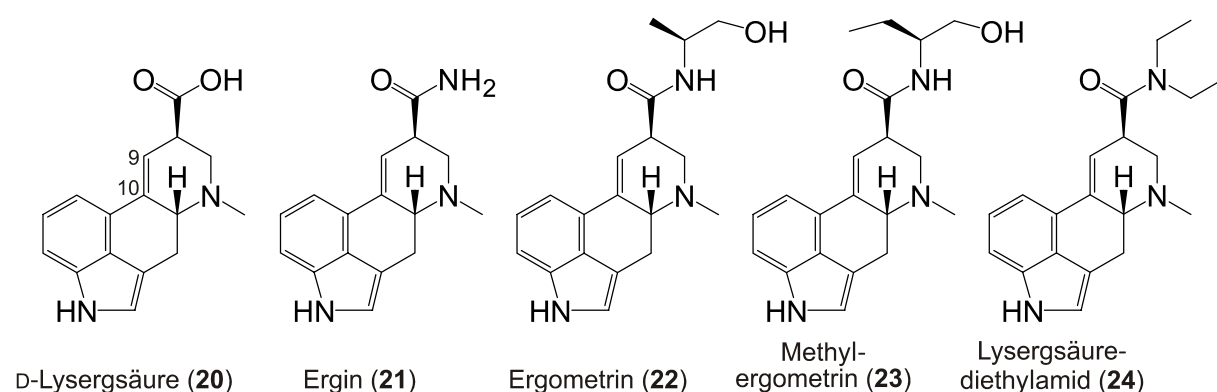


Abbildung 1-5: Strukturen von Ergoamiden.

1.2.3 D-Lysergsäurepeptide: Ergopeptide

Ergopeptide (**25**) sind Lysergsäurederivate mit einem bizyklischen Rest aus drei Peptiden, der über eine Amidbindung an die Carboxygruppe gebunden ist. Der Tripeptidrest von natürlich vorkommenden Ergopeptinen enthält immer Prolin und

bildet ein trizyklisches Ringsystem (Uhlig & Petersen 2008). Ergopeptine entstehen aus Ergopeptamen (**26**), dessen Tripeptide bizyklisch vorliegen (Abbildung 1-6). Ergopeptine wurden als dominierende Alkaloide aus den Sklerotien von *Claviceps purpurea* (*C. purpurea*) isoliert (Uhlig & Petersen 2008).

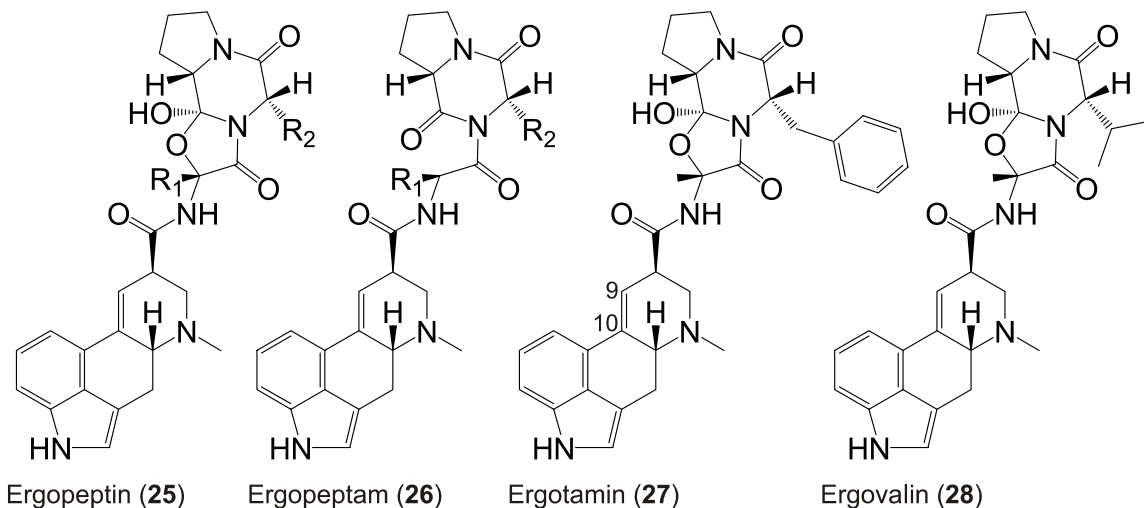


Abbildung 1-6: Strukturen der Ergopeptine und Ergopeptame.

Ergotamin (**27**) ist das zweifellos wichtigste Ergopeptin und wird von *C. purpurea* als dominantes Ergotalkaloid gebildet (Correia *et al.*, 2003; Haarmann *et al.*, 2008; Lee 2009b). Chemisch gesehen ist es ein D-Lysergsäurepeptid mit einem Peptidrest aus L-Alanin, L-Phenylalanin und L-Prolin. Ergotamin und sein semi-synthetisches Derivat Dihydroergotamin, bei dem die Doppelbindung zwischen C-9 und C-10 zu einer Einfachbindung reduziert ist, werden für die Behandlung von diversen Erkrankungen, inklusive akuten Migräneattacken und Clusterkopfschmerzen, klinisch genutzt (Halker *et al.*, 2010; Lovell & Marmura 2010; Robertson *et al.*, 2010; Saper & Silberstein 2006). Außerdem wird Dihydroergotamin für die Therapie von orthostatischer Hypotonie verwendet (Jourdan *et al.*, 2007). Ergovalin (**28**) trägt einen Peptidrest aus L-Alanin, L-Valin und L-Prolin und führt durch die Aufnahme von Endophyten-infiziertem Gras zu Vergiftungen in Viehbeständen (Fleetwood *et al.*, 2007; Schardl *et al.*, 2004).

Ergotoxin ist ein Gemisch aus den Ergopeptinen Ergocornin (**29**), Ergocristin (**30**), α -Ergocryptin (**31**) und β -Ergocryptin (**32**) (Abbildung 1-7). Diese Ergopeptine enthalten die beiden Aminosäuren L-Valin und L-Prolin im Peptidrest. Der Unterschied in den Strukturen besteht nur in der dritten Aminosäure, welche L-Valin, L-Phenylalanin, L-Leucin bzw. L-Isoleucin ist (Schiff 2006). Das natürlich vorkommende Ergotoxin ist das Ausgangsmaterial für die Semi-Synthese von 9,10-Dihydroergotoxin (auch bekannt als Codergocrin oder Ergoloid), das aus Dihydroergocornin, Dihydroergocristin sowie α - und β -Dihydroergocryptin besteht. 9,10-Dihydroergotoxin

wird als Methansulfonat (Mesylat) in einem Verhältnis 3:3:2:1 (w/w) zur Behandlung von Demenz und altersbedingter kognitiver Beeinträchtigung verwendet (Schiff 2006; Setnikar *et al.*, 2001). α -Dihydroergocryptin und Bromocriptin (2-Bromo- α -Ergocryptin), ein semi-synthetisches Derivat von α -Ergocryptin, werden für die Behandlung von frühem Morbus Parkinson genutzt (Bonuccelli *et al.*, 2009; Curran & Perry 2004; Martinez-Martin & Kurtis 2009).

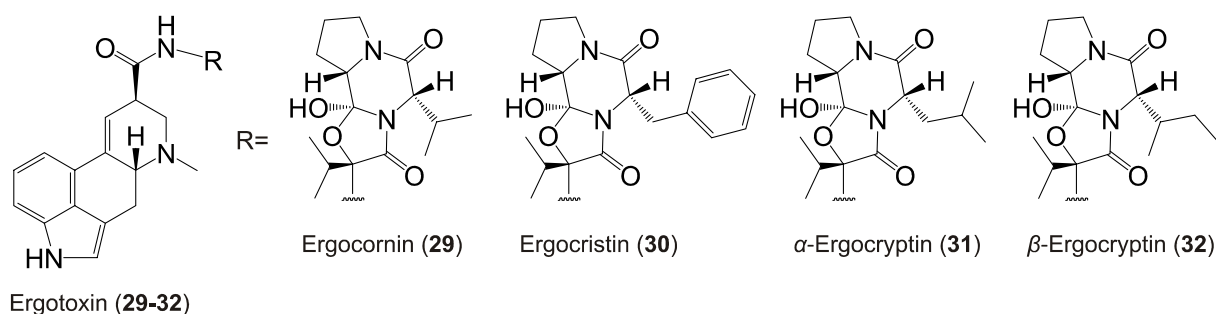


Abbildung 1-7: Strukturen von Ergotoxin.

1.2.4 Substanzen mit ergotalkaloidähnlichen Strukturen

Es wurden weitere Indolalkaloide aus verschiedenen Pilzstämmen isoliert, die sehr wahrscheinlich auch aus Tryptophan und Dimethylallyldiphosphat entstanden sind, aber ein modifiziertes Ergolinringsystem oder einen anderen stark veränderten Ring D besitzen (Abbildung 1-8) (Flieger *et al.*, 1997; Frisvad *et al.*, 2004). Epoxyagroclavin (**33**) aus *Penicillium kapuscinski* (Flieger *et al.*, 1997) und Cycloclavin (**34**) aus *Aspergillus japonicas* (Furuta *et al.*, 1982) können als Oxidationsprodukte von Agroclavin betrachtet werden. Rugulovasin A (**35**) und sein Stereoisomer Rugulovasin B (**36**) sowie ihre an C-8 chlorierten Derivative (**37** und **38**) wurden in verschiedenen Pilzstämmen gefunden, u.a. in *Penicillium*-Arten (Cole *et al.*, 1976; Dorner *et al.*, 1980; Flieger *et al.*, 1997; Yamatodani *et al.*, 1970). Paspacalvin (**39**) wurde aus *Claviceps paspali* isoliert (Tscherter & Hauth 1974). Die Substanzen **35** bis **39** besitzen die Ringe A, B und C des Ergolinringsystems. Ring D unterscheidet sich in diesen Substanzen durch verschiedene Zyklisierungsprozesse.

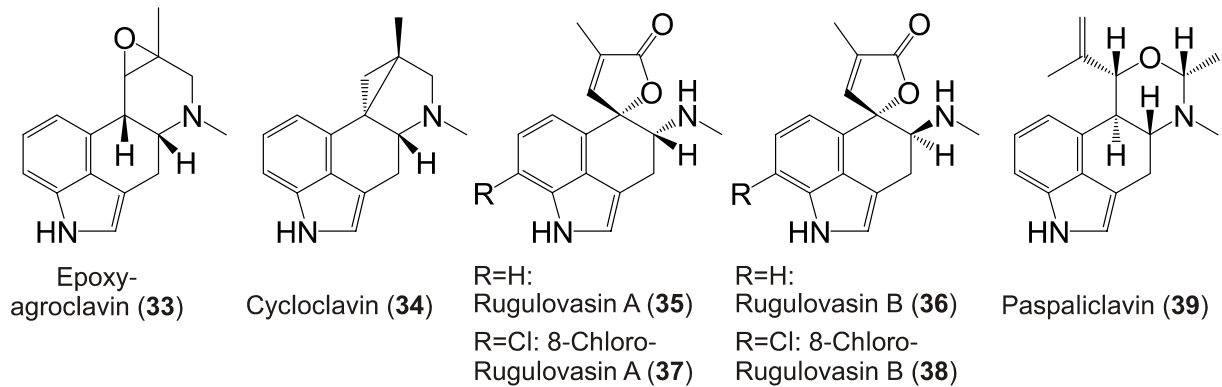


Abbildung 1-8: Strukturen ergotalkaloidähnlicher Substanzen.

1.3 Produzenten von Ergotalkaloiden

Ergotalkaloide werden sowohl von Pilzen der Familie Clavicipitaceae, z.B. *Claviceps* Arten und *Neotyphodium lolii*, als auch von Pilzen der Familie Trichocomaceae gebildet, zu denen *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten gehören (Gröger & Floss 1998; Schardl *et al.*, 2006). Die Isolierung von Ergotalkaloiden aus Pflanzenmaterial der Familien Convolvulaceae, Poaceae und Polygalaceae führte zu der Annahme, dass auch Pflanzen Ergotalkaloide produzieren (Gröger & Floss 1998). Allerdings zeigen neuere Untersuchungen, dass zumindest in den Familien Poaceae und Convolvulaceae Pflanzen-assoziierte Pilze für die Ergotalkaloidproduktion verantwortlich sind (Kucht *et al.*, 2004; Leistner & Steiner 2009; Markert *et al.*, 2008). Die Behandlung von *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) mit zwei Fungiziden inhibierte das Pilzwachstum und resultierte in dem kompletten Verlust der Ergotalkaloidproduktion (Kucht *et al.*, 2004). Ahimsa-Müller *et al.* (2007) konnte zeigen, dass vier verschiedene Pflanzen aus der Familie Convolvulaceae mit nahe verwandten Pilzen der Familie Clavicipitaceae infiziert waren, die alle die Gene für die Ergotalkaloidbiosynthese enthielten. 2011 wurde eine neue Gattung in der Familie Clavicipitaceae beschrieben, *Periglandula*, die zwei Arten enthält, *Periglandula ipomoeae* und *Periglandula turbinae*. Die Benennung erfolgte aufgrund der Namen ihrer Wirtspflanzen *Ipomoea asarifolia* bzw. *Turbina corymbosa* (Convolvulaceae) (Steiner *et al.*, 2011).

1.3.1 Produzenten von Alkaloiden des Clavin-Typs

Alkaloide des Clavin-Typs als Endprodukte im Biosyntheseweg werden hauptsächlich in *A. fumigatus* (Frisvad *et al.*, 2009), *Penicillium*-Stämmen wie *Penicillium roqueforti* (O'Brien *et al.*, 2006), *Penicillium verrucosum* (Zhelifonova *et*

al., 2009) und *Penicillium commune* (*P. commune*) (Vinokurova *et al.*, 2003b) gebildet, aber auch in einigen *Claviceps*-Arten wie *Claviceps fusiformis* (*C. fusiformis*), *Claviceps paspali* (*C. paspali*) und *Claviceps hirtella* (*C. hirtella*) (Flieger *et al.*, 1997).

Die Fumigaclavine A und B wurden sowohl in *A. fumigatus* als auch in *Penicillium*-Arten entdeckt (Cole *et al.*, 1977b; Janardhanan *et al.*, 1984; Ohmomo *et al.*, 1989; Vinokurova *et al.*, 2003b). Im Gegensatz dazu wird Fumigaclavin C nur in *A. fumigatus*, aber nicht in *Penicillium*-Arten gefunden (Frisvad *et al.*, 2009; Panaccione & Coyle 2005). *A. fumigatus* soll außerdem von den beiden Stereoisomeren Festuclavin und Pyroclavin nur Festuclavin produzieren (Panaccione & Coyle 2005; Spilsbury & Wilkinson 1961), während *Penicillium*-Arten sowohl Festuclavin als auch sein Stereoisomer Pyroclavin bilden (Cole *et al.*, 1983; Kawai *et al.*, 1992; Vinokurova *et al.*, 1991; Vinokurova *et al.*, 2003a; Vinokurova *et al.*, 2003b). 2012 konnte Matuschek *et al.* jedoch zeigen, dass zumindest *in vitro* neben Festuclavin auch Pyroclavin in kleinen Mengen mit den Enzymen aus *A. fumigatus* gebildet wird (Matuschek *et al.*, 2012). Agroclavin wird hauptsächlich von *Claviceps*-Stämmen produziert (Banks *et al.*, 1974; Boichenko *et al.*, 2003; Kren *et al.*, 1986; Pažoutová *et al.*, 1981; Schumann *et al.*, 1982). *C. fusiformis* ist der einzige bekannte Pilz aus der Familie Clavicipitaceae, der nur Alkaloide des Clavin-Typs, aber keine D-Lysergsäure-Derivate bilden kann (Banks *et al.*, 1974). *C. hirtella* produziert zwar ebenfalls hauptsächlich Clavine, aber auch Ergometrin mit einem Anteil von 3 bis 8 % der gesamten Ergotalkaloide (Lorenz *et al.*, 2009).

1.3.2 Produzenten von Ergoamiden und Ergopeptinen

Als Produzenten von Ergoamiden und Ergopeptinen konnten bisher nur Pilze der Familie Clavicipitaceae identifiziert werden. *C. purpurea* ist industriell der wichtigste Repräsentant aller Ergotalkaloidproduzenten. Die Ergotalkaloide werden in den Sklerotien gebildet (Lorenz *et al.*, 2009). Das Spektrum an Ergotalkaloiden variiert stark, je nach *C. purpurea*-Stamm (Lorenz *et al.*, 2009). Zum Beispiel produziert der Stamm P1 Elymoclavin, Ergotamin, die beiden Ergocryptine und Ergosin mit Ergotamin als Hauptprodukt (Correia *et al.*, 2003). Der Stamm ECC93 dagegen produziert Ergocristin und Ergotamin als Hauptprodukte und Ergometrin als Nebenprodukt (Haarmann *et al.*, 2008; Ortel & Keller 2009).

Zusätzlich zu den Pilzen der Gattung *Claviceps* produzieren Pilze der Gattung *Epichloë* und ihres asexuellen Gegenparts *Neotyphodium* sowie Pilze der Gattung *Balansia* Ergotalkaloide. In *Epichloë festucae* konnten beispielsweise Ergovalin und Ergin identifiziert werden (Schardl *et al.*, 2009). Diese Pilze stehen in symbiotischem

Verhältnis mit vielen Gräsern der Unterfamilie Pooideae (Familie Poaceae). Die Infektion mit den Pilzen gewährt der infizierten Pflanze etliche ökologische Nutzen. Dies sind u.a. der Schutz gegen Insekten, Wurzelnematoden und Pflanzenfresser sowie ein verbessertes Wachstum, insbesondere der Wurzeln und eine gesteigerte Toleranz gegen Trockenheit (Panaccione *et al.*, 2001; Schardl 2001; Schardl *et al.*, 2004). Bacetty *et al.* konnte zeigen, dass der Schutz gegen Nematoden auf Ergotalkaloiden basieren könnte. Ergovalin und α -Ergocryptin waren nematizid bei einer Konzentration von 5 bzw. 50 $\mu\text{g/ml}$, während Ergocornin und Ergometrin nematistatische Wirkung zeigten (Bacetty *et al.*, 2009).

Fleetwood *et al.* (2007) identifizierte das Gencluster für die Biosynthese von Ergovalin in *Epichloë festucae*. Die Gene des Clusters waren nur während des biotrophen Wachstums in Verbindung mit der Pflanze stark exprimiert. In dem Mycel einer axenischen Kultur, d.h. ohne den Wirtsorganismus, war die Expression sehr gering oder nicht detektierbar. Die Autoren folgerten daher, dass spezielle Signale oder Komponenten der Pflanze notwendig sind, um die Genexpression zu induzieren (Fleetwood *et al.*, 2007).

1.4 Gencluster für die Ergotalkaloidbiosynthese

1.4.1 Identifizierung der Gencluster in den Produzenten

1.4.1.1 Produzenten der Familie Clavicipitaceae

In Pilzen und Bakterien sind die Gene für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten gewöhnlich als ein fortlaufendes Segment auf dem Chromosom geclustert (Hoffmeister & Keller 2007; Luzhetska *et al.*, 2010; Osbourn 2010). Diese Besonderheit ermöglicht eine einfachere Identifizierung von Genen, die in die Biosynthese eines bestimmten Stoffes oder einer Stoffgruppe involviert sind. Die Identifizierung des ersten Genclusters für die Biosynthese von Ergotalkaloiden erfolgte 1999 in dem *C. purpurea*-Stamm P1. Dazu wurde das Gen *dmaW*, das für den ersten Schritt in der Biosynthese verantwortliche Enzym Dimethylallyltryptophansynthase (DMATS) codiert, für das *Genome Walking* verwendet (Tudzynski *et al.*, 1999). Das identifizierte Gencluster war jedoch unvollständig. Später fand eine Erweiterung auf einen Bereich von 68,5 kb statt, der 14 Gene enthält (Abbildung 1-9) (Correia *et al.*, 2003; Haarmann *et al.*, 2005).

In dem Weidelgras Pathogen *Neotyphodium lolii* Lp19 konnten fünf Gene mit Homologie zu Genen aus dem *C. purpurea*-Cluster identifiziert werden. Die fünf homologen Gene gehören zu dem putativen Cluster für die Ergovalinbiosynthese

(Fleetwood *et al.*, 2007). Zusammen mit Genen seines sexuellen Gegenstücks *Epichloë festucae* und Genen, die aus einer früheren Studie erhalten wurden (Panaccione *et al.*, 2001), konnten insgesamt 12 Gene identifiziert werden, die Homologie zu den Genen aus dem Cluster von *C. purpurea* aufweisen (Lorenz *et al.*, 2007; Wallwey & Li 2011).

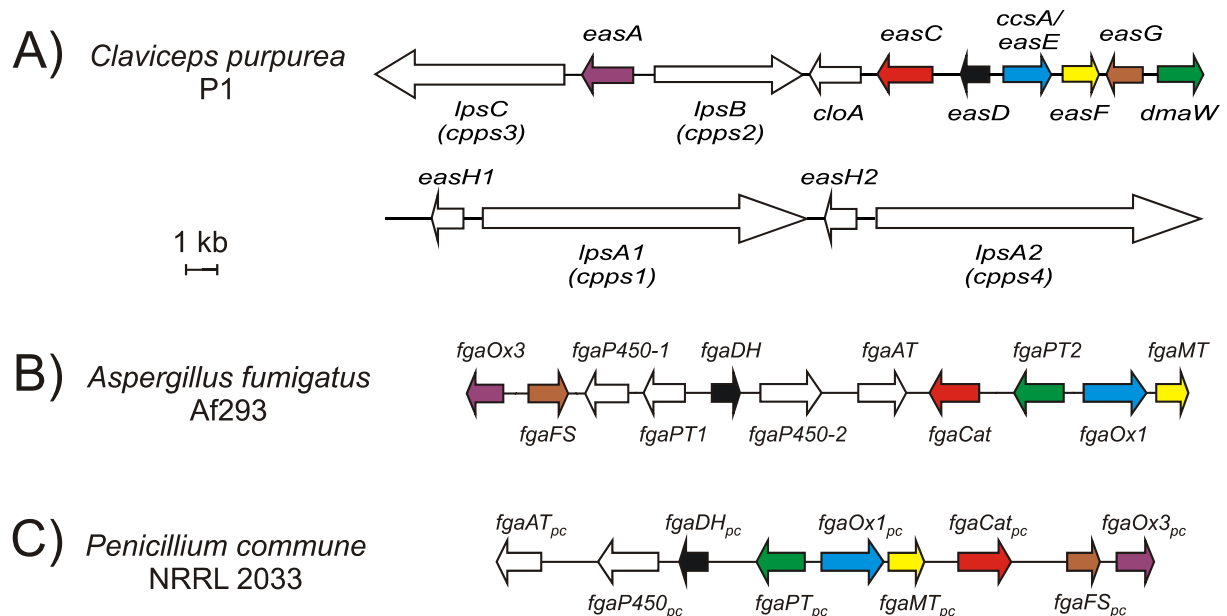


Abbildung 1-9: Gencluster für die Biosynthese von Ergotalkaloiden in (A) *Claviceps purpurea* P1 (modifiziert nach (Haarmann *et al.*, 2005)), (B) *Aspergillus fumigatus* Af293 und (C) *Penicillium commune* NRRL 2033. Die sieben homologen Gene sind jeweils farblich markiert.

1.4.1.2 Produzenten der Familie Trichocomaceae

Durch die in den letzten Jahren stark ansteigende Anzahl an verfügbaren Genomsequenzen von Bakterien und Pilzen (www.genomesonline.org) (Jones 2007) beschleunigte sich die Identifizierung von Genen, die in die Biosynthese von Sekundärmetaboliten involviert sind (Corre & Challis 2009; Keller *et al.*, 2005). Das Genom von *A. fumigatus* Af293 wurde beispielsweise als erstes von den *Aspergillus*-Arten sequenziert und die Sequenz 2003 der Öffentlichkeit zugänglich gemacht (Nierman *et al.*, 2005). Dadurch konnte sechs Jahre nach der Entdeckung des Ergotalkaloidgenclusters in *C. purpurea* P1 das Gencluster für die Biosynthese von Fumigaclavin C in der Genomsequenz von *A. fumigatus* Af293 durch bioinformatische Analysen entdeckt werden (Coyle *et al.*, 2007; Unsöld & Li 2005). Das putative Gencluster auf Chromosom 2 umspannt einen Bereich von 27 kb und enthält 11 Gene (Abbildung 1-9) (Unsöld & Li 2005). Drei Jahre später kam es zur Entdeckung eines fast identischen Clusters in der Genomsequenz des *A. fumigatus*-Stammes A1163, dessen Gene sehr hohe Sequenzidentitäten zu denen des

Stammes Af293 aufweisen (Li 2009; Steffan *et al.*, 2009). Die Gene liegen in beiden Stämmen in gleicher Orientierung und Reihenfolge zueinander vor.

P. commune NRRL 2033 produziert Fumigaclavin A (Unsöld & Li 2006; Vinokurova *et al.*, 2003b), dessen struktureller Unterschied zu Fumigaclavin C aus *A. fumigatus* ein fehlender Prenylrest an C-2 ist. Um die Gene für die Biosynthese von Fumigaclavinen identifizieren zu können, wurde eine Cosmid-Bibliothek der genomischen DNA von *P. commune* NRRL2033 angelegt. 3000 Cosmid-Klone wurden mittels PCR Amplifikation von *fgaPT*, dem homologen Gen zu *dmaW*, untersucht. Die Sequenzierung von drei positiven Cosmiden und die anschließende Analyse offenbarte ein putatives Cluster, das neun homologe Gene zu dem Gencluster von *A. fumigatus* enthält (Abbildung 1-9) (Unsöld 2006).

1.4.2 Der Zusammenhang zwischen den Informationen in den Genclustern und den Strukturmerkmalen der Ergotalkaloide

Während *C. purpurea* die komplexen Ergopeptine *via* D-Lysergsäure produziert, endet die Biosynthese von Ergotalkaloiden in *C. fusiformis* zu einem früheren Zeitpunkt und Agroclavin und Elymoclavin werden akkumuliert. Die Analyse des Ergotalkaloidgenclusters in *C. fusiformis* zeigt, dass im Vergleich zu dem Cluster aus *C. purpurea* nur die homologen Gene zu *lpsB* und *cloA*, nicht aber zu *lpsC*, *lpsA1* und *lpsA2* in *C. fusiformis* existieren (Lorenz *et al.*, 2007). Das Enzym CloA scheint in *C. purpurea* in die Bildung der D-Lysergsäure aus Elymoclavin involviert zu sein (Haarmann *et al.*, 2006).

Die *lps*-Gene codieren Nicht-Ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS). NRPSs sind große, multi-funktionale Enzyme, deren Gene häufig in Sekundärmetabolitgenclustern von Bakterien und Pilzen vorkommen (Osbourn 2010; Walsh & Fischbach 2010) und die für die Biosynthese der Peptidreste dieser Substanzen sorgen. Die Enzyme beinhalten ein oder mehrere Module, die für die Aktivierung einer Säure oder Aminosäure, ihre Modifikation und die Verknüpfung mit ihrem Reaktionspartner verantwortlich sind. Jedes Modul besitzt verschiedene Domänen, die jeweils unterschiedliche Reaktionen vermitteln (A: Adenylierung, T: Thiolierung, C: Kondensation, E: Epimerisierung). Die Thioesterase (TE) Domäne am C-terminalen Ende der meisten NRPSs entlässt das neu synthetisierte Peptid von dem Enzym (Du & Lou 2010; Stack *et al.*, 2007; von Döhren 2004). LpsA1 und LpsA2 sind trimodular (A₁TC₁A₂TC₂A₃TC₃) aufgebaut, während LpsB (ATC) und LpsC (ATCR, R: Reduktion) aus einem Modul bestehen. LpsB ist sehr wahrscheinlich für die Aktivierung der D-Lysergsäure, sowohl für die Ergoamide als auch die Ergopeptine, und ihren Einbau in die Moleküle verantwortlich (Correia *et al.*, 2003; Ortel & Keller

2009). LpsC scheint für die Bildung der Aminkomponente des Ergometrin zu sorgen, indem es die Aminosäure Alanin aktiviert. Die Umwandlung zu 2-Aminopropanol erfolgt während der Freisetzung des D-Lysergylalaninrests von dem Enzym LpsC in Gegenwart von NADPH (Ortel & Keller 2009). LpsA1 aktiviert dagegen die Aminosäuren Phenylalanin, Alanin und Prolin und ist in die Bildung von Ergotamin involviert (Haarmann *et al.*, 2008).

Lorenz *et al.* konnten zeigen, dass die Gene *cloA* und *lpsB* in *C. fusiformis* zwar exprimiert werden, aber keine funktionsfähigen Enzyme kodieren (Lorenz *et al.*, 2007). Die Autoren spekulierten daher, dass sich das Ergotalkaloidgencluster in *C. fusiformis* aus zuvor vollständigen Gencluster entwickelte, indem es zu einem Verlust von einigen *lps* Genen sowie Umordnungen und Mutationen kam, die zu den inaktiven Genen *lpsB* und *cloA* führten. Das Gencluster von *C. hirtella* enthält ebenso wie das Cluster von *C. fusiformis* keine Homologen zu den Genen *lpsA1* und *lpsA2*, dafür aber funktionsfähige *cloA*, *lpsB* und *lpsC* Gene (Lorenz *et al.*, 2009). Damit hat der Pilz das genetische Potential, Alkaloide vom Clavin-Typ und Ergometrin, aber keine Ergopeptine zu bilden. Die genetische Information stimmt daher mit den von *C. hirtella* tatsächlich produzierten Ergotalkaloiden überein (siehe auch Kapitel 1.3.1).

Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die Fumigaclavine von den Ergopeptinen durch das Fehlen eines Peptidrests. Stattdessen besitzen Fumigaclavin A und B eine Acetoxy- bzw. Hydroxygruppe an C-9 des Ergolinrings und Fumigaclavin C zusätzlich einen Prenylrest an C-2. Diese Unterschiede werden auch die Ergotalkaloidgencluster der verschiedenen Produzenten reflektiert. Die *lps* Gene, die beispielsweise in *C. purpurea* vorkommen und die Synthese des Peptidrests sowie dessen Verknüpfung mit dem Ergolinringsystem (genauer der D-Lysergsäure) katalysieren, existieren nicht in den Pilzen der Familie Trichocomaceae. Stattdessen enthalten die Gencluster in *A. fumigatus* und *P. commune* ein putatives Acetyltransferasegen (*fgaAT*), das für den Transfer einer Acetylgruppe von Acetyl-CoA an die Hydroxylgruppe an C-9 verantwortlich ist (Liu *et al.*, 2009). Das zweite Prenyltransferase Gen *fgaPT1* in dem Cluster von *A. fumigatus* katalysiert die Prenylierung von Fumigaclavin A zu Fumigaclavin C und kommt weder in Pilzen der Familie Clavicipitaceae noch in *P. commune* vor (Unsöld 2006; Unsöld & Li 2006). Dies ließ vermuten, dass in *P. commune* Fumigaclavin A und nicht Fumigaclavin C das Endprodukt der Ergotalkaloidbiosynthese ist. Bestätigt wurde diese Hypothese durch die Isolierung des in *P. commune* NRRL 2033 dominant gebildeten Ergotalkaloids und dessen Identifizierung als (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A (Matuschek *et al.*, 2012; Unsöld 2006; Unsöld & Li 2006).

1.5 Stand der Biosynthese von Ergotalkaloiden zu Beginn der Promotion

1.5.1 Die Bildung des tetrazyklischen Ergolinringsystems

Fütterungsexperimente mit isotoopenmarkierten Vorläufersubstanzen und Enzymextrakten von Ergotalkaloidproduzenten (Floss 1976; Gröger & Floss 1998; Schardl *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2000) offenbarten schon früh, dass der Ergolinring von Tryptophan und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) abgeleitet ist (Floss 1976; Williams *et al.*, 2000). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Chanoclavin-I-Aldehyd ein Intermediat in der Umsetzung von Chanoclavin-I zu Elymoclavin ist und dass vor dem Ringschluß eine Isomerisierung der Doppelbindung zwischen C-8 und C-9 stattfinden muss (Floss *et al.*, 1974; Hassam & Floss 1981).

Die Entdeckung der Gencluster sowohl für die Biosynthese von Ergoamiden und Ergopeptinen als auch von Alkaloiden des Clavin-Typs lieferte die Möglichkeit, die Gene heterolog zu exprimieren oder im Pilz zu inaktivieren und dadurch den Biosyntheseweg der verschiedenen Ergotalkaloide vollständig aufzuklären. Durch den Vergleich der verschiedenen Gencluster miteinander konnten sieben Gene identifiziert werden, deren Homologe in allen Ergotalkaloidgenclustern vorkommen und damit sehr wahrscheinlich für die Biosynthese des gemeinsamen tetrazyklischen Ergolinringsystems verantwortlich sind (Tabelle 1-1) (Unsöld & Li 2005). Zu Beginn dieser Dissertation Ende 2008 waren die Funktionen von nur zwei dieser sieben homologen Gene aufgeklärt.

Tabelle 1-1: Die homologen Proteine verschiedener Pilze der Familien Clavicipitaceae und Trichocomaceae, die in die Bildung des tetrazyklischen Ergolinringsystems involviert sind. Angegeben sind die accession number, die Länge der Proteine in Aminosäuren [AS] und die Sequenzidentitäten mit *Aspergillus fumigatus* (A.f.) sowie *Claviceps purpurea* (C.p.) in Prozent.

Proteinname für C.p. Proteinname für A.f.	DMATS FgaPT2	EasF/CpOrfB FgaMT	CcsA/CpOx1 FgaOx1	EasC/CpCat FgaCat	EasD/CpOx2 FgaDH	EasA/CpOx3 FgaOx3	EasG/CpOrfA FgaFS
<i>Claviceps purpurea</i>	CAB39314 ^a 448 AS 55 % mit A.f.	AAW57090 ^b 344 AS 53 % mit A.f.	CAB39328 ^a 483 AS 47 % mit A.f.	CAG28311 ^a 473 AS 56 % mit A.f.	CAB39316 ^a 261 AS 66 % mit A.f.	CAG28312 ^a 369 AS 57 % mit A.f.	AAW57089 ^b 290 AS 46 % mit A.f.
<i>Claviceps fusiformis</i> SD58 (Lorenz et al., 2007)	ABV57826 455 AS 68 % mit C.p.	ABV57824 355 AS 73 % mit C.p.	ABV57823 581 AS 66 % mit C.p.	ABV57821 479 AS 76 % mit C.p.	ABV57822 261 AS 79 % mit C.p.	ABV57819 382 AS 79 % mit C.p.	ABV57825 289 AS 60 % mit C.p.
<i>Neotyphodium lolii</i> <i>Epichloë festucae</i>	AAP81206 ^c 450 AS 65 % mit C.p.	ABM91451 ^d 344 AS 61 % mit C.p.	ABM91450 ^d 605 AS 54 % mit C.p.	ACM47224 ^e 476 AS 69 % mit C.p.	ACM47225 ^e 262 AS 71 % mit C.p.	ABM91449 ^d 380 AS 75 % mit C.p.	ABM91452 ^d 309 AS 52 % mit C.p.
<i>Penicillium commune</i> NRRL 2033 (Unsöld 2006)	480 AS 56 % mit A.f. 53 % mit C.p.	339 AS 60 % mit A.f. 54 % mit C.p.	588 AS 42 % mit A.f. 39 % mit C.p.	466 AS 66 % mit A.f. 57 % mit C.p.	261 AS 78 % mit A.f. 68 % mit C.p.	379 AS 64 % mit A.f. 51 % mit C.p.	286 AS 62 % mit A.f. 42 % mit C.p.
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293 (Nierman et al., 2005)	EAL94103 451 AS 55 % mit C.p.	EAL94105 339 AS 53 % mit C.p.	EAL94104 628 AS 47 % v C.p.	EAL94102 520 AS 56 % mit C.p.	EAL94099 261 AS 66 % mit C.p.	EAL94095 376 AS 57 % mit C.p.	EAL94096 290 AS 46 % mit C.p.

Die Sequenzen wurden erhalten von: ^a: *Claviceps purpurea* Stamm P1; (Tudzynski et al., 1999) ^b: *Claviceps purpurea* Isolat ATCC20102; ^c: *Epichloe typhina* x *Neotyphodium lolii* Isolat Lp1; (Wang et al., 2004) ^d: *Neotyphodium lolii* Stamm Lp19; (Fleetwood et al., 2007) und ^e: *Epichloe festucae* Stamm E2368

Die Biosynthese der Ergotalkaloide beginnt mit der Prenylierung von L-Tryptophan an Position C-4 des Indolrings in Anwesenheit von DMAPP (Abbildung 1-10). Diese Reaktion wird durch eine Prenyltransferase, d.h. einer 4-DMATS katalysiert, die im Falle von *A. fumigatus* von dem Gen *fgaPT2* und im Falle von *C. purpurea* von dem Gen *dmaW* kodiert wird (Schardl *et al.*, 2006; Unsöld & Li 2005). 2009 konnte die Struktur von FgaPT2 aufgeklärt werden (Metzger *et al.*, 2009). Der zweite Schritt in der Biosynthese ist die Methylierung des gebildeten 4-Dimethylallyltryptophan (4-DMAT) an der Aminogruppe. Mit Hilfe von aufgereinigtem rekombinanten Protein konnte gezeigt werden, dass die Methyltransferase FgaMT aus *A. fumigatus* für den Transfer einer Methylgruppe von dem Kofaktor S-Adenosylmethionin auf 4-DMAT verantwortlich ist (Rigbers & Li 2008). Das entstandene Produkt N-Methyl-Dimethylallyltryptophan wird auch 4-Dimethylallyl-L-Abrin (4-DMA-L-Abrin) genannt.

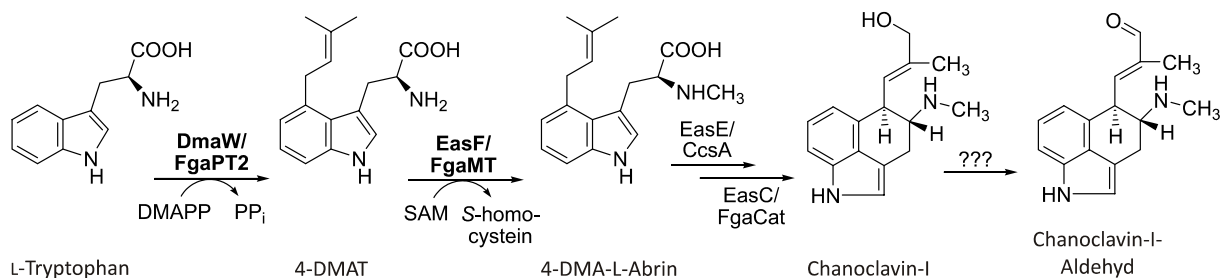


Abbildung 1-10: Die zu Beginn dieser Arbeit bereits aufgeklärten Schritte in der Biosynthese des Ergolinringsystems (fett) und die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen während dieser Arbeit.

Das nächste Intermediat, das in früheren Experimenten detektiert werden konnte, ist Chanoclavin-I (Abe *et al.*, 1969; Hassam & Floss 1981). Die Umsetzung von 4-DMAT-L-Abrin zu Chanoclavin-I schließt mindestens drei Reaktionen ein, eine Decarboxylierung, eine Zyklisierung und eine Hydroxylierung. Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, welche der sieben homologen Gene darin involviert sind. 2010 konnten Lorenz *et al.* zeigen, dass eine *ccsA* (vorher bekannt als *easE*) defiziente Mutante des *C. purpurea*-Stamms P1 4-DMA-L-Abrin und Spuren von 4-DMAT produziert (Lorenz *et al.*, 2010). Durch die Komplementation der Deletionsmutante mit einem Genkonstrukt, das für ein CcsA:GFP Fusionsprotein kodiert, wurde die Ergotalkaloidproduktion wiederhergestellt. CcsA ist daher sehr wahrscheinlich in die Bildung von Chanoclavin-I involviert. 2011 konnte dies durch die Inaktivierung des Homologs *fgaOx1* in *A. fumigatus* durch Goetz *et al.* bestätigt werden (Goetz *et al.*, 2011). Zusätzlich konnte die Gruppe zeigen, dass *fgaCat* eine Catalase kodiert, die ebenfalls in die Umsetzung von 4-DMA-L-Abrin zu Chanoclavin-I involviert zu sein scheint.

1.5.2 Die Biosynthese von Fumigaclavinen

Der Vergleich der Gencluster für die Biosynthese von Ergoamiden und Ergopeptinen mit den Genclustern für die Biosynthese von Fumigaclavinen in *A. fumigatus* und *P. commune* führte auch zu der Identifizierung der Gene, die vermutlich für die Bildung der Fumigaclavine aus dem gemeinsamen Vorläufermolekül verantwortlich sind. Von den drei Genen, die im Cluster von *A. fumigatus* existieren (*fgaP450-2*, *fgaAT* und *fgaPT1*), kommen zwei Homologe auch in *P. commune* vor (*fgaP450* und *fgaAT*), aber nicht in *C. purpurea*. Die drei Gene *fgaP450-2*, *fgaAT* und *fgaPT1* codieren für eine putative Hydroxylase, Acetyltransferase und Prenyltransferase (Li & Unsöld 2006). Bereits vor Beginn dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das rekombinante Protein FgaPT1 die letzte Reaktion in der Biosynthese von Fumigaclavin katalysiert, d.h. die Prenylierung von Fumigaclavin A zu Fumigaclavin C in der Anwesenheit von DMAPP (Abbildung 1-11) (Unsöld & Li 2006). 2009 konnte dem vorherigen Schritt das entsprechende Enzym zugeordnet werden. Das Protein FgaAT ist für die Acetylierung von Fumigaclavin B zu Fumigaclavin A in der Anwesenheit von Acetyl-CoA verantwortlich (Liu *et al.*, 2009). Das Cytochrom P450 Enzym FgaP450-2 von *A. fumigatus* und sein Homolog FgaP450_{pc} von *P. commune* katalysieren vermutlich die Bildung von Fumigaclavin B (Wallwey & Li 2011).

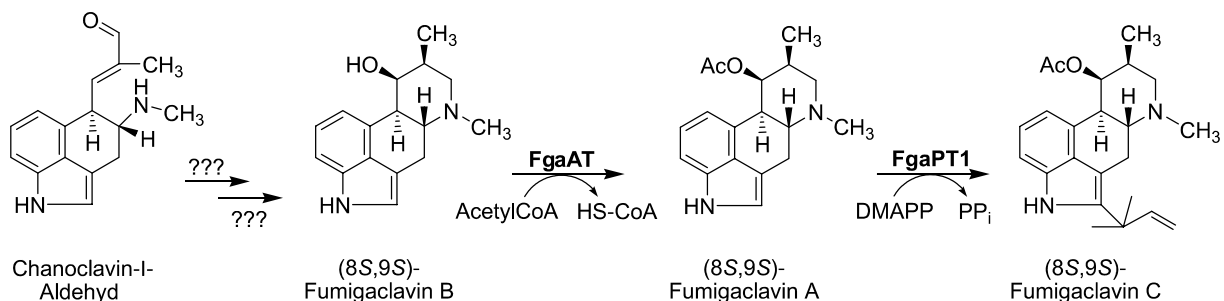


Abbildung 1-11: Die zu Beginn dieser Arbeit bereits aufgeklärten Schritte in der Biosynthese von Fumigaclavin C in *A. fumigatus* (fett).

2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

Charakterisierung der Proteine FgaDH und FgaOx3, FgaFS aus *Aspergillus fumigatus* B5233

Zielsetzung dieser Arbeit war u.a. die Aufklärung der Biosynthese des gemeinsamen Strukturmerkmals der Ergotalkaloide, des tetrazyklischen Ergolinringsystems, anhand der Gene von *A. fumigatus*. Dazu sollten die drei Gene *fgaDH*, *fgaOx3* und *fgaFS*, deren Homologe in allen Ergotalkaloidgenclustern vorkommen, den von ihnen katalysierten Schritten im Biosyntheseweg zugeordnet werden. Folgende Arbeiten waren dazu geplant:

- Heterologe Expression der Gene in *E. coli*
- Suche nach dem jeweiligen Substrat der Enzyme und den benötigten Kofaktoren
- Identifikation des enzymatischen Produkts mittels NMR- und MS-Analysen
- Biochemische Charakterisierung der Proteine

Versuche zur Prenylierung verschiedener Ergotalkaloide und deren Vorläufermoleküle durch FgaPT1 aus *Aspergillus fumigatus*

Da die zwei Derivate von (8S,9S)-Fumigaclavin C, die 2009 aus *A. fumigatus* isoliert wurden (Ge *et al.*, 2009), strukturell C-2 prenyliertem Festuclavin (9-Deacetoxy-(8S)-Fumigaclavin C) bzw. C-2 prenyliertem (8S,9S)-Fumigaclavin B (9-Deacetyl-(8S,9S)-Fumigaclavin C) entsprechen, sollte untersucht werden, ob dafür ebenfalls die Prenyltransferase FgaPT1 verantwortlich sein könnte, die Fumigaclavin A zu C prenyliert. Weiterhin sollte die Substratspezifität von FgaPT1 erneut untersucht werden, da mittlerweile Alkaloide vom Clavin-Typ (Pyroclavin, Agroclavin) und einige Vorläufersubstanzen (4-DMA-L-Abrin, Chanoclavin-I-Aldehyd) enzymatisch hergestellt werden können.

Untersuchungen zu dem putativen Ergotalkaloidgencluster in Pilzen der Familie Arthrodermataceae anhand von *Arthroderma benhamiae* CBS 112371

Die bioinformatische Analyse der zur Verfügung stehenden Genomsequenzen offenbarte die Möglichkeit eines Ergotalkaloidgenclusters in Pilzen der Familie Arthrodermataceae. Dieses Gencluster sollte in der Anzahl seiner Gene genauer analysiert werden und das mögliche Endprodukt identifiziert werden. Dazu sollten folgende Arbeiten mit *A. benhamiae* CBS 112371 durchgeführt werden:

- Expression des Homologs von *fgaDH* und Charakterisierung der von diesem Protein katalysierten Reaktion
- Expression der Gene in Nachbarschaft zu den Genen, die homolog zu den Genen im Fumigaclavin C-Cluster von *A. fumigatus* sind
- Versuch der Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd mit einem dieser Proteine oder Proteinkombinationen
- Analyse der Kulturüberstände von *A. benhamiae* CBS 112371 mittels HPLC und DC auf Ergotalkaloide und speziell auf Chanoclavin-I-Aldehyd
- Analyse der Expression von Genen aus dem Cluster mittels Northern Blot durch Christoph Heddergott (HKI, Jena)

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Säulenmaterialien und Enzyme

3.1.1 Chemikalien

Die hier verwendeten Chemikalien wurden vorwiegend von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und VWR (Darmstadt) bezogen. Bestandteile zur Herstellung von Kulturmedien wurden hauptsächlich von der Firma AppliChem (Darmstadt) verwendet. Agroclavin, Chanoclavin-I, Ergometrin und Festuclavin wurden freundlicherweise von Prof. Leistner (Bonn) zur Verfügung gestellt. DMAPP wurde freundlicherweise von Marco Matuschek synthetisiert und zur Verfügung gestellt. (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A stellte freundlicherweise Beate Wollinsky und (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin B Xia Yu zur Verfügung. Spezielle Chemikalien sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 3-1: Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile.

Hersteller	Bezeichnung
Bioline GmbH, Luckenwalde	dNTP Mix 100 mM (jeweils 25 mM)
Eurisotop, Saarbrücken	Chloroform-D1 Methanol-D4 Dimethylsulfoxid-D6
Roth, Karlsruhe	Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)
Serva, Heidelberg	Coomassie Brilliant Blau R-250
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	L-Abrin Ergotamin D-Tartrat

3.1.2 Materialien zur Chromatographie

Die Säulenmaterialien wurden als Trockensubstanzen, Suspensionen oder Fertigsäulen vom Hersteller bezogen.

Tabelle 3-2: Chromatographiematerial.

Hersteller	Säulenmaterial
GE Healthcare, Freiburg	HiLoad 16/60 Superdex (Fertigsäule) Sephadex LH-20 Sephadex G-25 PD-10, NAP-5 (Fertigsäulen)

Hersteller	Säulenmaterial
CS Chromatographie Service, Langerwehe	Multospher RP 18-5 (Fertigsäule, 5 µm, 250 x 4 mm)
Merck, Darmstadt	Multospher RP 18-5 (Fertigsäule, 5 µm, 250 x 10 mm)
Qiagen, Hilden	DC-Alufolien Kieselgel 60 F ₂₅₄
	Ni-NTA-Agarose (Suspension)

3.1.3 Enzyme und Kits

Tabelle 3-3: Enzyme, Größenstandards und Kits.

Hersteller	Bezeichnung
Fermentas, St. Leon-Roth	GeneRuler DNA Ladder Mix
GE Healthcare, Freiburg	Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis
Invitrogen, Karlsruhe	SYBR® Safe DNA Gel stain
Jena BioScience, Jena	Restriktionsendonukleasen T4-DNA-Ligase
Promega, Mannheim	pGEM-T Easy Vector System I
Roth, Karlsruhe	RNase A
Roche Applied Science, Mannheim	Expand High Fidelity Plus PCR System
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Lysozym Catalase aus <i>Aspergillus niger</i>
SLG Südlaborbedarf, Gauting	HiYield PCR Clean-up and Gel-Extraction Kit

3.2 Nährmedien und Puffer

Nachfolgend sind alle hier verwendeten Medien aufgeführt. Die Mengen beziehen sich jeweils auf 1 l Medium. Für Festmedien wurden vor dem Autoklavieren (20 min, 121 °C) 1,5-2 % (w/v) Agar zugesetzt. Die Antibiotika wurden erst nach dem Autoklavieren steril zugegeben. Die Lagerung der Medien erfolgte bei 4 °C.

3.2.1 Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium

NaCl	10,0 g
Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g

Die Bestandteile wurden in bidest. Wasser gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

TB-Medium

Bacto-Trypton	12,0 g
Bacto-Hefeextrakt	24,0 g
Glycerin ($\geq 99,5\%$)	4,0 ml

Die Bestandteile wurden in 900 ml bidest. Wasser gelöst und autoklaviert. Anschließend wurden 100 ml einer sterilen Lösung von 0,17 M KH_2PO_4 und 0,72 M K_2HPO_4 zugegeben.

3.2.2 Antibiotika

Antibiotikallösungen wurden auf Vorrat hergestellt und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Wässrige Lösungen wurden mit einem Spritzenfilter (Porengröße $0,2\text{ }\mu\text{m}$) sterilfiltriert. Bei Festmedien fand die Zugabe von Antibiotika nach Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf unter $60\text{ }^\circ\text{C}$ statt.

Tabelle 3-4: Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Konz. der Stammlösung [mg/ml] (Lösungsmittel)	Arbeitskonzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Hersteller
Carbenicillin	50 (H_2O)	50	Roth
Chloramphenicol	50 (EtOH)	12,5	Roth
Kanamycin	50 (H_2O)	25	Roth
Tetrazyklin	12,5 (H_2O)	12,5	Roth

3.2.3 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Puffer mit bidest. Wasser angesetzt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.3.1 Puffer und Lösungen zur DNA-IsolierungTabelle 3-5: Puffer und Lösungen zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
Miniprep-Lösung I	Tris-Base	50 mM
	EDTA	10 mM
	Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren	
	Vor Gebrauch 100 $\mu\text{g/ml}$ RNase A zugeben	
Miniprep-Lösung II	NaOH	0,2 M
	SDS	1 % (w/v)

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
Miniprep-Lösung III	Kaliumacetat	3 M (pH 5,5)
TE-Puffer	Tris-HCl	10 mM (pH 8,0)
	EDTA	1 mM

3.2.3.2 Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese

Tabelle 3-6: Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
50 x TAE-Puffer	Tris-Base	2 M
	Essigsäure 96 %	6 % (v/v)
	EDTA	50 mM
	Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren	
6 x Ladepuffer	Glycerin	30 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)

3.2.3.3 Puffer zur Proteinaufreinigung

Tabelle 3-7: Puffer zur Reinigung von Proteinen mittels Nickel-Affinitätschromatographie.

Puffer	Zusammensetzung	
Lysepuffer (Lagerung: 4 °C)	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	10 mM
	Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren	
Waschpuffer (Lagerung: 4 °C)	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	20 mM
	Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren	
Elutionspuffer (Lagerung: 4 °C)	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM
	Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren	
Proteinlagerungspuffer (Lagerung: 4 °C)	Tris-HCl	50 mM (pH 7,5)
	Glycerin	15 % (v/v)

3.2.3.4 Puffer und Lösungen zur *Sodium dodecylsulfate*-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung

Tabelle 3-8: Puffer und Lösungen zur SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Trenngel 12 % 4 Gele: (8 cm × 5,8 cm × 0,75 mm)	6,8 ml bidest. Wasser 5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 200 µl 10 % (w/v) SDS 8,0 ml Rotiphorese®Gel 30 300 µl 10 % (w/v) APS 10 µl TEMED
Trenngel 15 % 4 Gele: (8 cm × 5,8 cm × 0,75 mm)	4,6 ml bidest. Wasser 5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 200 µl 10 % (w/v) SDS 10,2 ml Rotiphorese®Gel 30 300 µl 10 % (w/v) APS 10 µl TEMED
Sammelgel 4 % 4 Gele: (8 cm × 1,5 cm × 0,75 mm)	3,05 ml bidest. Wasser 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 50 µl 10 % (w/v) SDS 650 µl Rotiphorese®Gel 30 150 µl 10 % (w/v) APS 10 µl TEMED
10 × SDS-Puffer	250 mM Tris-Base 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS ad 500 ml bidest. Wasser
5 × Protein-Probenpuffer (Lagerung: -20 °C)	250 mM Tris-HCl (pH 6,8) 500 mM DTT 10 % (w/v) SDS 0,5 % (w/v) Bromphenolblau 50 % (v/v) Glycerin ad 10 ml bidest. Wasser
Färbelösung Coomassie	0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250 10 % (v/v) Essigsäure 50 % (v/v) Methanol ad 1000 ml bidest. Wasser
Entfärberlösung Coomassie	20 % Ethanol 10 % Essigsäure ad 500 ml bidest. Wasser

3.2.3.5 Puffer für die Größenausschlusschromatographie und das Bradford-Reagenz zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Tabelle 3-9: Puffer für die Größenausschlusschromatographie und das Bradford-Reagenz zur Proteinkonzentrationsbestimmung.

Puffer	Zusammensetzung
FPLC-Puffer (Lagerung: 4 °C)	Tris-Base 50 mM NaCl 150 mM Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren
5 × Bradford Reagenz (Lagerung: 4 °C)	70 mg Serva Blau G in 50 ml Ethanol gelöst 50 % (v/v) 85 %ige Phosphorsäure ad 200 ml bidest. Wasser

Das 5 × Bradford Reagenz wurde mit bidest. Wasser auf 1 × Bradford-Reagenz verdünnt und über Nacht im Dunkeln bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte die Filtration des Reagenz über einen Faltenfilter (Bradford 1976).

3.3 Plasmide, Primer, Bakterienstämme

3.3.1 Plasmide

Tabelle 3-10: Klonierungs- und Expressionsvektoren.

Vektor	Beschreibung	Hersteller/Referenz
pGEM-T Easy	Linearisierter Vektor mit einem T-Überhang am 3'-Ende zum direkten Einklonieren von PCR-Produkten mit A-Überhang am 3'-Ende, <i>lacZ</i> , ori, f1 ori, Amp ^R	Promega, Mannheim
pHis8	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Kan ^R , f1-Origin, pBR322-Origin, T7-Promotor, Sequenz für N-terminalen (His) ₈ -tag und C-terminalen (His) ₆ -tag	(Jez et al., 2000)
pQE-60	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , T5-Promotor, ColE1, Amp ^R , Sequenz für C-terminalen (His) ₆ -tag	Qiagen, Hilden
pQE-70	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , T5-Promotor, ColE1, Amp ^R , Sequenz für C-terminalen (His) ₆ -tag	Qiagen, Hilden

Tabelle 3-11: Plasmid-Konstrukte. Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten, relevanten Klonierungs- und Expressionskonstrukte sind im Folgenden aufgeführt.

Plasmid	Beschreibung
pCW01	Klonierungskonstrukt für <i>fgaDH</i> aus <i>A. fumigatus</i> (GQ413954), PCR amplifiziertes Fragment (798 bp, Primer: <i>fgaDH_for</i> und <i>fgaDH_rev2</i>) aus cDNA von <i>A. fumigatus</i> B5233, kloniert in pGEM-T Easy
pCW02	Klonierungskonstrukt für <i>fgaOx3</i> aus <i>A. fumigatus</i> (GU929211), PCR amplifiziertes Fragment (1147 bp, Primer: <i>fgaOx3_for</i> und <i>fgaOx3_rev2</i>) aus cDNA von <i>A. fumigatus</i> B5233, kloniert in pGEM-T Easy
pCW03	Expressionskonstrukt für <i>fgaDH</i> aus <i>A. fumigatus</i> , 786 bp <i>NcoI-BamHI</i> -Fragment aus pCW01, kloniert in pQE-60
pCW04	Expressionskonstrukt für <i>fgaOx3</i> aus <i>A. fumigatus</i> , 1129 bp <i>SphI-BamHI</i> -Fragment aus pCW02, kloniert in pQE-70
pCW05	Klonierungskonstrukt für ARB_04644 aus <i>A. benhamiae</i> CBS 112371 (ABSU01000001.1: bp 1954228 - bp 1954623); PCR amplifiziertes Fragment (415 bp, Primer: A.b.EFE37116_for und A.b.EFE37116_rev) aus gDNA, kloniert in pGEM-T Easy
pCW06	Expressionskonstrukt für ARB_04644 aus <i>A. benhamiae</i> CBS 112371; 395 bp <i>NcoI-BamHI</i> -Fragment aus pCW05, kloniert in pQE-60
pCW07	Klonierungskonstrukt für ARB_04650 aus <i>A. benhamiae</i> CBS 112371 (ABSU01000001.1: bp 1966587 - bp 1967188); Fusions-PCR amplifiziertes Fragment (530 bp, Primer: A.b.EFE37122_for, A.b.EFE37122_P2, A.b.EFE37122_P3 und A.b.EFE37122_rev) aus gDNA, kloniert in pGEM-T Easy
pCW08	Expressionskonstrukt für ARB_04650 aus <i>A. benhamiae</i> CBS 112371; 515 bp <i>NcoI-BamHI</i> -Fragment aus pCW07, kloniert in pQE-60
pCW09	Klonierungskonstrukt für verkürztes ARB_04651 aus <i>A. benhamiae</i> CBS 112371 (ABSU01000001.1: bp 1967616 - bp 1968893); PCR amplifiziertes Fragment (1297 bp, Primer: A.b.EFE37123_for und A.b.EFE37123_rev) aus gDNA, kloniert in pGEM-T Easy
pCW10	Expressionskonstrukt für verkürztes ARB_04651 aus <i>A. benhamiae</i> CBS 112371; 1277 bp <i>NcoI-BamHI</i> -Fragment aus pCW09, kloniert in pQE-60
pCW11	Klonierungskonstrukt für ARB_04652 aus <i>A. benhamiae</i> CBS 112371 (ABSU01000001.1: bp 1969924 - bp 1970838); PCR amplifiziertes Fragment (944 bp, Primer: A.b.EFE37124_for und A.b.EFE37124_rev) aus gDNA, kloniert in pGEM-T Easy
pCW12	Expressionskonstrukt für ARB_04652 aus <i>A. benhamiae</i> CBS 112371; 921 bp <i>BamHI-HindIII</i> -Fragment aus pCW11, kloniert in pHIS8

Plasmid	Beschreibung
pCW13	Klonierungskonstrukt für ARB_04651 aus <i>A. benhamiae</i> CBS 112371 (ABSU01000001.1: bp 1967616 - bp 1969376); Fusions-PCR amplifiziertes Fragment (1588 bp, Primer: A.b.EFE37123_P1, A.b.EFE37123_P2, A.b.EFE37123_P3 und A.b.EFE37123_rev) aus gDNA, kloniert in pGEM-T Easy
pCW14	Expressionskonstrukt für ARB_04651 aus <i>A. benhamiae</i> CBS 112371; 1568 bp <i>NcoI</i> - <i>Bam</i> HI-Fragment aus pCW13, kloniert in pQE-60
pCW15	Klonierungskonstrukt für ARB_04646 aus <i>A. benhamiae</i> CBS 112371 (ABSU01000001.1: bp 1957951 - bp 1958808); Fusions-PCR amplifiziertes Fragment (758 bp, Primer: A.b.EFE37118_for, A.b.EFE37118_P2, A.b.EFE37118_P3 und A.b.EFE37118_rev) aus gDNA, kloniert in pGEM-T Easy
pCW16	Expressionskonstrukt für ARB_04646 aus <i>A. benhamiae</i> CBS 112371; 740 bp <i>NcoI</i> - <i>Bam</i> HI-Fragment aus pCW15, kloniert in pQE-60
pCW17	Klonierungskonstrukt für <i>chaDH</i> aus <i>A. benhamiae</i> CBS 112371 (ABSU01000001.1: bp 1957951 - bp 1958808); Fusions-PCR amplifiziertes Fragment (812 bp, Primer: <i>chaDH</i> _1_for, <i>chaDH</i> _2, <i>chaDH</i> _3 und <i>chaDH</i> _4_rev) aus gDNA, kloniert in pGEM-T Easy
pCW18	Expressionskonstrukt für <i>chaDH</i> aus <i>A. benhamiae</i> CBS 112371; 794 bp <i>NcoI</i> - <i>Bam</i> HI-Fragment aus pCW17, kloniert in pQE-60

3.3.2 Primer

Tabelle 3-12: Oligonukleotide. Fettgedruckte Buchstaben entsprechen mutierten Basen, die zu den unterstrichenen Restriktionsschnittstellen führten. (*NcoI*: CCATGG, *Bam*HI: GGATCC, *Hind*III: AAGCTT, *Sph*I: GCATGC, *Bgl*II: AGATCT)

Primer	Sequenz (5'-3')	Plasmid
<i>fgaOx3_for</i>	G <u>GCATGCG</u> GAGAAGAACCGTCC	pCW02
<i>fgaOx3_rev2</i>	TTCTCG <u>GGATCC</u> GACGGGGA	pCW02
A.b.EFE37116_for	TATCCG <u>CCATGG</u> GAGAATCCCGCAAC	pCW05
A.b.EFE37116_rev	CTGTAGCT <u>GGATCC</u> TTGCTCATAAATGTG	pCW05
A.b.EFE37118_for bzw. <i>chaDH</i> _1_for	CACAAAA <u>CCATGG</u> CATCTGTCTCCTCA	pCW15, pCW17
A.b.EFE37118_P2	CTTGTATGTCTCTTCAACCTCCTCAGGGGAAACG GTATTAGCTCGT	pCW15
A.b.EFE37118_P3	ACGAGCTAATACCGTTTCCCCTGAGGAGGTTGAA GAGACATACAAG	pCW15
A.b.EFE37118_rev bzw. <i>chaDH</i> _4_rev	ATCAAG <u>GGATCC</u> AGGCATACAGGCGC	pCW15, pCW17

Primer	Sequenz (5'-3')	Plasmid
<i>chaDH_2</i>	CAGCATCGGCGTCCTTGTGATTCCAGGGGAAAC GGTATTAGCTCGT	pCW17
<i>chaDH_3</i>	ACGAGCTAATACCGTTTCCCCTGGAATCACAAGG ACGCCGATGCTG	pCW17
A.b.EFE37122_for	GCTGAC <u>CCATGG</u> CTCCAGGCG	pCW07
A.b.EFE37122_P2	AGCTGGAGAATGTGATATCCATGCAATTGTACAG CGCCGCACCACCCGCT	pCW07
A.b.EFE37122_P3	AGCGGGTGGTGC GGCGCTGTACAATTGCATGGA TATCACATTCTCCAGCT	pCW07
A.b.EFE37122_rev	GATC <u>GGATCC</u> AATGAGCAAGCTGG	pCW07
A.b.EFE37123_for	GGTCAGC <u>CCATGG</u> AGAAGACAGGTT	pCW09
A.b.EFE37123_rev	TCAGGT <u>GGATCC</u> TTTACTGCCCATCTTC	pCW09, pCW13
A.b.EFE37123_P1	ACCCGAAAC <u>CCATGG</u> CTCCTGCAGTGA	pCW13
A.b.EFE37123_P2	GATACTGTTCAAAGCAAGTTAGCTCATCAAAGC ATACTGAAGC	pCW13
A.b.EFE37123_P3	GCTTCAGTATGCTTTTGATGAGCTAACTTGCTTTG AACAGTATC	pCW13
A.b.EFE37124_for	CCAATACC <u>GGATCC</u> ATGCCACCAATT	pCW11
A.b.EFE37124_rev	AGGTGAAAA <u>AAGCTT</u> TTTACTTGCCATCCATACC	pCW11
A.b.EFE37125_for	AACAGCCG <u>CGATGC</u> ATTCCCAACA	-
A.b.EFE37125_rev	AGACATGCAGAC <u>GGATCC</u> CAGCTTTAACATGG	-
EFE37125_rev_neu	GCAGAC <u>GGATCC</u> CAGCTTTAACAT	-

3.3.3 Bakterienstämme

Tabelle 3-13: Bakterienstämme von *E. coli*.

<i>E. coli</i>	Beschreibung/relevante Marker	Hersteller/Referenz
XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ <i>recA1 endA1gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^fZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Invitrogen, Karlsruhe
SoluBL21™	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)†	Genlantis
† Der Stamm enthält uncharakterisierte Mutationen, die durch spezielle Selektionskriterien erhalten wurden. Diese Mutationen machen es dem Stamm möglich, unlösliche Proteine vollständig oder teilweise in löslicher Form zu exprimieren. (Herstellerangabe)		
M15[pREB4]	Nal ^S Str ^S Rif ^S Thi ⁻ Lac ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ F ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺ Km ^R	Qiagen, Hilden

3.4 Methoden der Molekularbiologie

3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurden mit einem MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, München) durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) hergestellt. Ein PCR-Ansatz mit *Taq*-Polymerase (Tabelle 3-14) diente dazu, die für die jeweiligen Primer optimale Anlagerungstemperatur zu bestimmen. Je 10 µl des erhaltenen PCR-Produktes wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Kapitel 3.4.2). Anschließend erfolgte eine PCR mit dem *Expand High Fidelity Plus PCR System* von Roche nach Herstellerangaben.

Bei einer Fusions-PCR zur Eliminierung einer Intronsequenz erfolgt in der 1. Runde die getrennte Amplifikation der Exons mit speziellen Primern. Durch die Primer wird an jedem Exon ein Überhang angefügt, der aus einem Teil der Sequenz des anderen Exons besteht. Die Intronsequenz wird dadurch eliminiert. Da die Überhänge komplementär zueinander sind, können sie in der 2. PCR-Runde hybridisieren und die Polymerase verlängert die Sequenzen.

Tabelle 3-14: Standard-PCR-Ansatz mit der *Taq*-Polymerase.

Substanz	Endkonzentrationen
<i>Taq</i> -Puffer (10 ×)	1 ×
dNTP Mix 1:10 (2,5 mM von jedem dNTP)	200 µM von jedem dNTP
Plasmid-DNA bzw. gDNA	10-100 ng
Primer for (c = 10 pmol/µl)	200 nM
Primer rev (c = 10 pmol/µl)	200 nM
<i>Taq</i> -Polymerase (1-3 U/µl)	0,5-1,5 U
Gesamt-Volumen	15 µl

3.4.1.1 PCR zur Amplifikation von *fgaOx3* mit mutiertem Stopcodon

Unter Verwendung der Primer *fgaOx3_for* und *fgaOx3_rev* (Tabelle 3-12) wurde ein PCR-Fragment mit einer Länge von 1147 bp aus Plasmid-DNA (pMM004) amplifiziert, die von Marco Matuschek zur Verfügung gestellt wurde. Das Plasmid pMM004 enthält das Gen *fgaOx3* mit dem natürlichen Stopcodon in pGEM-T Easy. Dabei wurde durch den Primer *fgaOx3_for* eine *SphI*-Schnittstelle über das Startcodon und durch den Primer *fgaOx3_rev* eine *BamHI*-Schnittstelle über das natürliche Stopcodon eingeführt. Die PCR wurde mit dem Programm in Tabelle 3-15 durchgeführt.

Tabelle 3-15: Das Programm für die PCR mit *Taq*-Polymerase (links) bzw. dem *Expand High Fidelity Plus PCR System* (rechts).

Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur	Dauer	Zyklen
95 °C	5 min	1	94 °C	2 min	1
95 °C	60 s	25	94 °C	30 s	25
40-63 °C	60 s		48 °C	60 s	
72 °C	90 s		72 °C	90 s	
72 °C	10 min	1	72 °C	7 min	1
4 °C	∞		4 °C	∞	

3.4.1.2 PCR zur Amplifikation von *ARB_04643*, *ARB_04646*, *ARB_04650*, *ARB_04651*, *ARB_04652* und *ARB_04653*

Die Amplifikation der Gene erfolgte aus gDNA von *A. benhamiae* mit normaler PCR oder Fusions-PCR. Das Standard-PCR Programm für das *Expand High Fidelity Plus PCR System* befindet sich in Tabelle 3-17. Das PCR-Programm für die Fusions-PCR war für die 1. und 2. Runde identisch. Die genauen Anlagerungstemperaturen der einzelnen Gene sind in Tabelle 3-16 angegeben.

Tabelle 3-16: Verwendete Anlagerungstemperaturen für die Gene.

Gen	Anlagerungstemperatur
<i>ARB_04643</i>	61,4 °C
<i>ARB_04646</i>	64 °C
<i>ARB_04650</i>	56 °C
<i>ARB_04651</i> (gekürzte Sequenz)	56 °C
<i>ARB_04651</i>	56 °C
<i>ARB_04652</i>	60 °C

Tabelle 3-17: Das Standard-Programm für die PCR mit dem *Expand High Fidelity Plus PCR System*.

Temperatur	Dauer	Zyklen
94 °C	2 min	1
94 °C	30 s	30
56-64 °C	30 s	
72 °C	60 s	
72 °C	7 min	1
4 °C	∞	

Für die Amplifikation des Gens *ARB_04652* wurden nur Versuche mit *Taq*-Polymerase durchgeführt (Tabelle 3-18).

Tabelle 3-18: Die beiden PCR-Programme mit *Taq*-Polymerase zur Amplifikation des Gens *ARB_04652*.

Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur	Dauer	Zyklen
95 °C	4 min	1	95 °C	4 min	1
95 °C	60 s	25	95 °C	60 s	25
50-66 °C	60 s		56-70 °C	80 s	
72 °C	60 s		72 °C	80 s	
72 °C	7 min	1	72 °C	7 min	1
4 °C	∞		4 °C	∞	

3.4.1.3 PCR zur Amplifikation von *chaDH*

In der 1. Runde der Fusions-PCR wurde unter Verwendung der Primer *chaDH_1_for* und *chaDH_2* ein Fragment mit einer Länge von 630 bp und unter Verwendung der Primer *chaDH_3* und *chaDH_4_rev* ein Fragment mit einer Länge von 228 bp aus gDNA von *A. benhamiae* amplifiziert. Das größere Fragment beinhaltete das Exon von *chaDH* am 5'-Ende, das kleinere Fragment das Exon am 3'-Ende. Dabei wurde durch den Primer *chaDH_1_for* eine *NcoI*-Schnittstelle und durch den Primer *chaDH_4_rev* eine *BamHI*-Schnittstelle über das natürliche Stopcodon eingeführt. In der 2. PCR-Runde wurden die beiden Fragmente fusioniert und ein Fragment mit einer Länge von 812 bp erhalten. Dieses Fragment enthielt die codierende Sequenz von *chaDH* ohne Intron. Die PCR wurde mit den Programmen in Tabelle 3-19 durchgeführt. Das PCR-Programm für die Fusions-PCR war für die 1. und 2. Runde identisch.

Tabelle 3-19: Das Programm für die PCR mit *Taq*-Polymerase (links) bzw. dem *Expand High Fidelity Plus PCR System* (rechts).

Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur	Dauer	Zyklen
95 °C	4 min	1	94 °C	2 min	1
95 °C	60 s	30	94 °C	30 s	30
50-64 °C	60 s		46-50 °C	30 s	
72 °C	60 s		72 °C	60 s	
72 °C	10 min	1	72 °C	7 min	1
4 °C	∞		4 °C	∞	

3.4.2 Agarosegel-Elektrophorese

Die für die Agarosegel-Elektrophorese verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 3-6 aufgeführt. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte durch horizontale Elektrophorese mit Agarosegelen in einer Konzentration von 1,0 bis 1,5 % Agarose in TAE-Puffer. Zur späteren Detektion unter UV-Licht wurden 100 ml Gellösung mit 10 µl SYBR Safe DNA Gel stain (Invitrogen) versetzt. Die DNA-Proben wurden nach Mischen mit 6 × DNA-Ladepuffer im Verhältnis 6:1 auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1 × TAE-Puffer bei einer Spannung von 90 Volt (Compact-Mini Kammer MBT 20 EL) bzw. 120 V (Compact-Midi Kammer MBT 30 EL). Der verwendete Größenstandard war *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Fermentas). Die Dokumentation erfolgte mit der Kamera Olympus SP-500 UZ mit einem UV-Filter.

3.4.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Gelextraktion und die anschließende Aufreinigung wurde das *HiYield PCR Clean-up and Gel-Extraction* Kit von Südlaborbedarf verwendet. Dazu wurde die gewünschte Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in dem entsprechenden Volumen DF-Buffer gelöst. Die Elution eines PCR-Produkts aus der 2. Runde einer Fusions-PCR erfolgte mit 15 µl sterilfiltriertem, bidest. Wasser.

Für die Umklonierung in den Expressionsvektor wurden die Gelstücke des aus pGEM-T Easy herausgeschnittenen Inserts und die Gelstücke des mit denselben Enzymen geschnittenen Expressionsvektors zusammen in einem Reaktionsgefäß in einem Verhältnis 1:1 in DF-Puffer nach Herstellerangaben gelöst. Die Elution erfolgte mit 25 µl sterilfiltriertem, bidest. Wasser.

3.4.4 Restriktion von DNA

Analytische Restriktionen wurden in einem Volumen von 10 µl mit verschiedenen Restriktionsenzymen in den mitgelieferten Reaktionspuffern unter den jeweils vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt. Präparative Restriktionen zur anschließenden Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden in größeren Volumina bis zu 100 µl durchgeführt. Das Abstoppen der Reaktionen erfolgte durch Zugabe von DNA-Probenpuffer und Lagerung auf Eis.

3.4.4.1 Partielle Restriktion

Aufgrund der internen zusätzlichen *NcoI*- bzw. *SphI*-Schnittstelle mussten die Plasmide pCW01 und pCW02 zuerst mit *Bam*HI für 60 min bei 37 °C komplett verdaut werden. Anschließend wurde das entsprechende zweite Enzym zugegeben und der Ansatz weitere 30 sek inkubiert. Das Abstoppen der Reaktionen erfolgte durch Zugabe von DNA-Probenpuffer und Lagerung auf Eis.

3.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation eines PCR-Produkts mit dem Klonierungsvektor pGEM-T Easy wurden diese in einem Verhältnis von 1:1 bei kleinen Inserts und bis 4:1 bei größeren Inserts eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde entweder direkt nach der PCR eingesetzt oder zuvor durch Gelelektrophorese und anschließende Gelextraktion aufgereinigt. Die Ligation erfolgte mit der Ligase und dem Puffer aus dem pGEM-T Easy Vector System für 2 bis 5 h, je nach Größe des Inserts, bei 22 °C. Die Ligation für die Umklonierung in den entsprechenden Expressionsvektor erfolgte mit T4-Ligase für 16 h bei 16 °C. In Tabelle 3-20 ist die Zusammensetzung der Ligationsansätze aufgelistet. Die Ligationsansätze wurden ohne weitere Behandlung direkt zur Transformation von *E. coli* verwendet (Kapitel 3.4.6.2).

Tabelle 3-20: Ansatz für die Ligation in pGEM-T Easy (links) bzw. den Expressionsvektor (rechts).

	Volumen		Volumen
PCR-Produkt	3,5 µl	Elution von der Gelextraktion	21,0 µl
pGEM-T Easy	0,5 µl	T4-Ligase	1,0 µl
T4-DNA Ligase	1,0 µl	T4-DNA Ligase	2,4 µl
2x Rapid Buffer	5,0 µl	Gesamt-Volumen	24,4 µl
Gesamt-Volumen	10,0 µl		

3.4.6 CaCl₂-vermittelte Transformation von *E. coli*

3.4.6.1 Herstellung kompetenter Zellen

Alle Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen und bei 4 °C bzw. auf Eis. 100 ml LB-Medium wurden mit dem entsprechenden Antibiotikum und mit 2 µl *E. coli* Zellen aus einer Glycerin-Dauerkultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 220 rpm. Anschließend wurden 100 ml LB-Antibiotikum-Medium mit 2 ml dieser Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer optischen Dichte

bei 600 nm (OD_{600}) von 0,6 kultiviert. Die Zellen wurden in einem 50 ml Reaktionsgefäß bei $6000 \times g$ und $4^\circ C$ für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 30 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Nach einem erneuten Zentrifugations-schritt für 10 min bei $6000 \times g$ und $4^\circ C$ wurde das Pellet wiederum in 30 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und anschließend für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach für 10 min bei $6000 \times g$ und $4^\circ C$ pelletiert und in 3 ml 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung mit 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Von den Zellen wurden 100 μl und 200 μl Aliquots hergestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80^\circ C$ gelagert.

3.4.6.2 $CaCl_2$ -vermittelte Transformation von *E. coli* und Blau-Weiß-Selektion

Für die Hitzeschock-Transformation wurden 100 μl chemisch-kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und die einzubringende DNA zugegeben. Bei der Transformation von XL1-Blue MRF' Zellen wurde 1 μl Plasmid-DNA auf 100 μl Zellen gegeben. Bei der Transformation von BL21 Zellen, M15 Zellen bzw. soluBL21 Zellen wurden 0,5 μl Plasmid-DNA auf 100 μl Zellen gegeben. Nach einer Ligation wurde der gesamte Ligationsansatz auf 100 μl XL1-Blue MRF' Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 45 sek bei $42^\circ C$. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 400 μl LB-Medium ohne Antibiotikum zugegeben und die Zellen für 1 h bei $37^\circ C$ unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei $4000 \times g$ für 1 min pelletiert, der Überstand bis auf etwa 200 μl abgenommen und die Zellen darin resuspendiert. Die Zellen wurden auf eine LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei $37^\circ C$ inkubiert.

Bei Transformationen mit dem Klonierungsvektor pGEM-T Easy, der das *lacZ*-Gen enthielt, wurde eine Blau-Weiß Selektion durchgeführt. Dazu wurde die Platte vor dem Ausplattieren des Transformationsansatzes mit einer Lösung aus 40 μl X-Gal-Lösung (20 mg/ml in DMF), 7 μl IPTG-Lösung (1 M) und 153 μl sterilfiltriertem Wasser bestrichen. Das toxische DMF wurde durch Verdampfen entfernt, indem die Platte 45 min offen unter der Sterilbank stand. Die Transformationsansätze wurden anschließend wie oben beschrieben ausplattiert und inkubiert.

3.4.7 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* (Alkalische Lyse)

Es wurden 3-5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einem Klon der Transformationsplatte angeimpft und über Nacht bei 220 rpm und $37^\circ C$ inkubiert. 2 ml dieser Übernachtskultur wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen für 5 min bei $4^\circ C$ und $4000 \times g$ pelletiert. Das Pellet wurde in 250 μl Miniprep-

Lösung I resuspendiert, 250 µl Miniprep-Lösung II zugegeben, 6 mal invertiert und maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 250 µl Miniprep-Lösung III und 6-maligem Invertieren erfolgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Nach 20 min bei $14000 \times g$ und 4°C wurde der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1 Vol. Isopropanol zugegeben. Die präzipitierte DNA wurde bei $14000 \times g$ und 4°C für 30 min pelletiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet an der Luft getrocknet war, wurde es in 50 µl steril filtriertem Wasser aufgenommen. Bei Plasmiden mit dem Expressionsvektor pHis8 wurden nur 25 µl Wasser verwendet. Von der restlichen Kultur wurden für eine Glycerin-Dauerkultur 600 µl mit 450 µl Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

3.5 Methoden der Biochemie

3.5.1 Heterologe Expression von Genen in *E. coli*

Für die heterologe Expression wurden 100 ml Medium mit 2 ml bzw. 1000 ml Medium mit 20 ml einer Übernachtskultur angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37°C und 220 rpm bis zu einer OD_{600} von ca. 0,6 kultiviert. Die Induktion der Genexpression erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen an IPTG bei verschiedenen Temperaturen für unterschiedliche Zeiten. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation ($4000 \times g$, 8 min, 4°C) pelletiert, in Lysepuffer resuspendiert und bis zur weiteren Aufreinigung (Kapitel 3.5.2) bei -80°C gelagert. Die Aufnahme der Pellets aus 100 ml Kultur erfolgte in 1 ml Lysepuffer. Das Pellet aus 1000 ml Kultur wurde in 12 ml Lysepuffer aufgenommen.

3.5.2 Reinigung von Hexahistidin-Fusionsproteinen mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Das bei -80°C gelagerte resuspendierte Pellet wurde aufgetaut, 1 mg/ml Lysozym zugegeben und gemischt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Lyse der Zellen durch Ultraschall (Branson Sonifier 250) mit 7 Zyklen von je 10 sek bei 200 Watt auf Eis durchgeführt. Die aufgeschlossenen Zellen wurden für 25 min bei 4°C und $10000 \times g$ zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein kleines Becherglas überführt, Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose) zugegeben und auf Eis gerührt. Es wurden 25 µl Ni-NTA-Agarose für Rohextrakt aus 100 ml Zellkultur bzw. 150 bis 600 µl für Rohextrakt aus 1000 ml Zellkultur verwendet.

Nach 60 min wurde die Suspension auf einen leeren Säulenkörper mit Fritte überführt. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 4 bzw. 8 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 2,0 bzw. 2,5 ml Elutionspuffer. Die Elutionsfraktion wurde zum Entsalzen auf eine mit Proteinlagerungspuffer äquilibrierte PD10-Säule gegeben, gegebenenfalls mit Proteinlagerungspuffer auf 2,5 ml aufgefüllt und mit insgesamt 3,5 ml Proteinlagerungspuffer eluiert. Die Elution erfolgte in 500 µl Schritten. Gegebenenfalls wurden die Fraktionen 1 und 7, 2 und 6 sowie 3 bis 5 vereint. Von jeder Elutionsfraktion wurde ein Teil für eine Konzentrationsbestimmung mittels SDS-PAGE (Kapitel 3.5.3) abgenommen. Die Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.5.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung

Die diskontinuierliche SDS-PAGE mit Sammel- und Trenngel wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Die notwendigen Puffer und Lösungen sind in Tabelle 3-8 aufgeführt. Verwendet wurde die Mini-PROTEAN® 3 Elektrophorese-Zelle der Firma Bio-Rad (München). Das 12 oder 15 %-ige Trenngel wurde mit einem 4 %-igen Sammelgel überschichtet. Die zu analysierenden Proben wurden in einem Verhältnis von 5:1 mit 5 × Protein-Probenpuffer gemischt. Als Proteingrößenstandard wurde *low molecular weight SDS marker* (GE Healthcare) verwendet, der nach Herstellerangaben vorbereitet wurde. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben und der Proteingrößenstandard für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 60 min mit einer Spannung von 150 V. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend bis zur gewünschten Entfärbung in der Entfärbelösung inkubiert und dann mit Wasser gewaschen.

3.5.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Proteingehalts von Lösungen wurde eine Kalibrierungsgerade mit 1 mg/ml BSA-Lösung erstellt. Dazu wurden 1 bis 10 µg BSA mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5 auf 100 µl aufgefüllt und mit 1 ml 1 × Bradford-Reagenz gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm mit einem UV-Spektrometer gemessen. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und aus den Mittelwerten der Absorptionen die Kalibrierungsgerade erstellt. Die zu bestimmende Probe wurde vor der Verwendung mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5 auf ein Volumen von 100 µl gebracht und anschließend mit 1 ml 1 × Bradford Reagenz

gemischt. Die Proteinlösung wurde so eingesetzt, dass die Absorption in einem Bereich von 0,3 - 0,7 lag.

3.5.5 Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen mittels Größenausschlusschromatographie

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts von Proteinen wurde eine ÄKTaprime™ plus Anlage der Firma GE Healthcare (Freiburg) mit einer HiLoad 16/60 Superdex 200-Säule eingesetzt, die zuvor mit FPLC-Puffer (Tabelle 3-9) äquilibriert worden war. Die Aufzeichnung erfolgte mit dem Rekorder LKB Bromma 2210 2-Channel Recorder. Die Anlage wurde stets bei einer Temperatur von 4 °C betrieben. Die Fließmittel wurden vor der Verwendung filtriert (Porengröße 0,2 µm) und entgast.

Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit Dextranblau 2000 (2000 kDa), Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Conalbumin (75 kDa), Carbonanhydrase (29 kDa) und Ribonuclease A (13,7 kDa). Die Flussrate betrug 1 ml/min.

3.5.6 Enzymatische Reaktionsansätze

3.5.6.1 Herstellung von DMA-L-Abrin mit FgaPT2

Für die Herstellung von 4-DMA-L-Abrin aus L-Abrin mit FgaPT2 wurde ein 5 ml Ansatz angesetzt. Er enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM CaCl₂, 1 mM L-Abrin, 2 mM DMAPP und 1 mg His₈-FgaPT2. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C. 60 µl des Ansatzes wurden mit 1 Vol. Methanol abgestoppt, 10 min bei 10000 × g und 4 °C zentrifugiert und mittels HPLC analysiert. Als Standard diente 1 mM L-Abrin. Der restliche Ansatz wurde ohne Zugabe von Methanol in 50 µl Aliquots aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.5.6.2 Reaktionsansätze mit FgaDH-His₆ und DMA-L-Abrin als Substrat

Der Standardansatz (100 µl) enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM des Kofaktors einzeln oder in Kombination und 5 µg FgaDH-His₆. Dabei wurden die folgenden Kombinationen an Kofaktoren verwendet: FAD und NADH, FAD und NADPH, FMN und NADH, FMN und NADPH. Die Kofaktoren wurden in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 gelöst und der pH gemessen und eventuell auf pH 7,5 nachjustiert. Als Substrat diente ein 50 µl Aliquot der Reaktion von FgaPT2 mit L-Abrin. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C. Die Ansätze wurden mit 1 Vol. Methanol abgestoppt, 10 min bei 10000 × g und 4 °C

zentrifugiert und mittels HPLC analysiert. Als Standard diente ein Gemisch aus DMA-L-Abrin und Chanoclavin-I sowie die Reaktionsansätze mit Hitze-inaktiviertem FgaDH-His₆. Dazu wurde das Protein für 30 min bei 100 °C erhitzt.

3.5.6.3 Reaktionsansätze mit FgaDH-His₆ und Chanoclavin-I als Substrat

Der Standardansatz (100 µl) enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM Chanoclavin-I, 5 mM NAD⁺ und 5 µg FgaDH-His₆. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C. Die Ansätze wurden mit 1 Vol. Methanol abgestoppt, 10 min bei 10000 × g und 4 °C zentrifugiert und mittels HPLC analysiert. Als Kontrolle diente ein Reaktionsansatz mit Hitze-inaktiviertem FgaDH-His₆.

Für die Messung der Ionenabhängigkeit wurden zu dem Standardansatz je 5 mM des entsprechenden Metallions bzw. EDTA gegeben. Als Kontrolle diente ein Standardansatz ohne Zugabe von Metallionen bzw. EDTA. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37 °C.

Für die Abhängigkeit von der Proteinmenge wurden 0, 1, 2, 3, 5, 10, 25 µg FgaDH-His₆ verwendet und die Ansätze 15 min inkubiert. Für die Abhängigkeit von der Zeit wurde der Standardansatz mit 1 µg FgaDH-His₆ angesetzt und für 0, 4, 12, 20, 30, 50, 90 bzw. 150 min bei 37 °C inkubiert.

Für die Bestimmung der Michaelis-Menten Konstanten (K_M -Wert) von Chanoclavin-I enthielten die Ansätze 10 mM NAD⁺, 1 µg FgaDH-His₆ und 0, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1 und 2 mM Chanoclavin-I. Für die Bestimmung des K_M -Werts von NAD⁺ enthielten die Ansätze 1 mM Chanoclavin-I, 1 µg FgaDH-His₆ und 0, 0,15, 0,3, 0,5, 0,7, 1, 1,5, 3, 5 und 10 mM NAD⁺. Die Inkubation erfolgte jeweils für 15 min bei 37 °C.

3.5.6.4 Reaktionsansätze zur Isolierung des enzymatischen Produkts mit FgaDH-His₆

Für die Isolierung des enzymatischen Produkts zur Strukturaufklärung wurde ein 20 ml Ansatz mit 2 mg FgaDH-His₆ durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 4 h bei 37 °C. Anschließend wurde der Ansatz mit Ammoniumhydroxid auf pH 9 eingestellt und zweimal mit 2 Vol. Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bei einer Wasserbadtemperatur von 32 °C bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 400 µl Methanol aufgenommen und die Substanzen mittels HPLC isoliert.

3.5.6.5 Reaktionsansätze mit FgaOx3-His₆

Bei den Tandeminkubationen wurde in der 1. Inkubation Chanoclain-I mit FgaDH-His₆ umgesetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatzes mit Natriumhydroxid auf pH 9 gebracht und der Ansatz zweimal mit 2 Vol. Ethylacetat extrahiert. Die vereinten Ethylacetatphasen wurden in einer Vakuumzentrifuge zur Trockene eingengt und der Rückstand nach Resuspendieren in 2 µl DMSO als Substrat für die nächste Inkubation verwendet. Die 2. Inkubation enthielt standardmäßig 5 µg FgaOx3-His₆, 5 mM FMN und/oder 5 mM NADH. Die Ansätze wurden mit 1 Vol. Methanol abgestoppt, 10 min bei 10000 × g und 4 °C zentrifugiert und mittels HPLC analysiert.

Der Standardansatz (100 µl) einer Koinkubation enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM Chanoclain-I, 5 mM NAD⁺, 5 µg FgaDH-His₆, 5 µg aktives oder Hitze-inaktiviertes FgaOx3-His₆, 5 mM FMN und/oder 5 mM NADH. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 30 °C. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit Natriumhydroxid auf pH 9 gebracht und der Ansatz zweimal mit 2 Vol. Ethylacetat extrahiert. Die vereinten Ethylacetatphasen wurden in einer Vakuumzentrifuge zur Trockene eingengt und nach Resuspendieren des Rückstands in 100 µl Methanol mittels HPLC analysiert.

3.5.6.6 Reaktionsansätze zur Isolierung des enzymatischen Produkts mit FgaOx3-His₆

Für die Isolierung des enzymatischen Produkts zur Strukturaufklärung wurde ein 20 ml Ansatz mit jeweils 1,5 mg FgaDH-His₆ und FgaOx3-His₆ durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 30 °C. Anschließend wurde der Ansatz mit Ammoniumhydroxid auf pH 9 eingestellt und zweimal mit 2 Vol. Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bei einer Wasserbadtemperatur von 32 °C bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 250 µl Methanol aufgenommen und die Substanzen mittels HPLC isoliert.

3.5.6.7 Reaktionsansätze mit FgaFS-His₆

Bei den Tandeminkubationen wurde in der 1. Inkubation Chanoclain-I mit FgaDH-His₆ oder mit FgaDH-His₆ und FgaOx3-His₆ umgesetzt. Anschließend wurde der pH des Reaktionsansatzes mit Natriumhydroxid auf 9 gebracht und der Ansatz zweimal mit 2 Vol. Ethylacetat extrahiert. Die vereinten Ethylacetatphasen wurden in einer Vakuumzentrifuge zur Trockene eingengt und der Rückstand nach Resuspendieren in 2 µl DMSO als Substrat für die nächste Inkubation verwendet. Die 2. Inkubation enthielt

5 mM FMN, 5 mM NADH, 5 µg FgaOx3-His₆ und/oder 5 µg FgaFS-His₆. Gegebenenfalls wurde eine 3. Inkubation mit 5 mM FMN, 5 mM NADH und 5 µg FgaFS-His₆ durchgeführt.

Der Standardansatz (100 µl) einer Koinkubation enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM Chanoclain-I, 5 mM NAD⁺, 5 µg FgaDH-His₆, 5 µg FgaOx3-His₆ und aktives oder Hitze-inaktiviertes FgaFS-His₆, 5 mM FMN und/oder 5 mM NADH. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 30 °C. Anschließend wurde der pH des Reaktionsansatzes mit Natriumhydroxid auf 9 gebracht und der Ansatz zweimal mit 2 Vol. Ethylacetat extrahiert. Die vereinten Ethylacetatphasen wurden in einer Vakuumzentrifuge zur Trockene eingengt und nach Resuspendieren des Rückstands in 100 µl Methanol mittels HPLC analysiert.

3.5.6.8 Reaktionsansätze zur Isolierung des enzymatischen Produkts mit FgaOx3-His₆ und FgaFS-His₆

Für die Isolierung des enzymatischen Produkts zur Strukturaufklärung wurde ein 20 ml Ansatz mit jeweils 1,5 mg FgaDH-His₆, FgaOx3-His₆ und FgaFS-His₆ durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 30 °C. Anschließend wurde der Ansatz mit Ammoniumhydroxid auf pH 9 eingestellt und zweimal mit 2 Vol. Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bei einer Wasserbadtemperatur von 32 °C bis zur Trockene eingengt, der Rückstand in 250 µl Methanol aufgenommen und die Substanzen mittels HPLC isoliert.

3.5.6.9 Reaktionsansätze mit FgaPT1

Der Standardansatz (100 µl) enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 1 mM des jeweiligen Substrats, 2 mM DMAPP und 5 µg His₆-FgaPT1. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 30 °C. Die Ansätze wurden mit 1 Vol. Methanol abgestoppt, 10 min bei 10000 × g und 4 °C zentrifugiert und mittels HPLC analysiert. Als Kontrolle dienten die Ansätze mit Hitze-inaktiviertem His₆-FgaPT1.

3.5.6.10 Reaktionsansätze mit ChaDH-His₆

Der Standardansatz (100 µl) enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM Chanoclain-I, 5 mM NAD⁺ und 5 µg ChaDH-His₆. Die Inkubation erfolgte für 4 h bei 37 °C. Anschließend wurde der pH-Wert des Reaktionsansatzes mit Natriumhydroxid auf 9

gebracht und der Ansatz zweimal mit 2 Vol. Ethylacetat extrahiert. Die vereinten Ethylacetatphasen wurden in einer Vakuumzentrifuge zur Trockene eingengt und nach Resuspendieren des Rückstands in 100 μ l Methanol mittels HPLC analysiert. Als Kontrolle diente ein Reaktionsansatz mit Hitze-inaktiviertem ChaDH-His₆. Der Ansatz für die Kontrolle der Rückreaktion (100 μ l) enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), circa 1 mM isoliertes Chanoclavin-I-Aldehyd, 5 mM NADH und 5 μ g ChaDH-His₆.

Für die Messung der Ionenabhängigkeit wurden zu dem Standardansatz je 5 mM des entsprechenden Metallions bzw. EDTA gegeben. Als Kontrolle diente ein Standardansatz ohne Zugabe von Metallionen bzw. EDTA. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37 °C.

Für die Abhängigkeit von der Proteinmenge wurde 0, 1, 2, 3, 5, 10, 25 μ g ChaDH-His₆ verwendet und die Ansätze 10 min inkubiert. Für die Abhängigkeit von der Zeit wurde der Standardansatz mit 1 μ g ChaDH-His₆ angesetzt und für 0, 4, 12, 20, 30, 50, 90 bzw. 150 min bei 37 °C inkubiert.

Für die Bestimmung des K_M -Werts von Chanoclavin-I enthielten die Ansätze 10 mM NAD⁺, 1 μ g ChaDH-His₆ und 0, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1 und 2 mM Chanoclavin-I. Für die Bestimmung des K_M -Werts von NAD⁺ enthielten die Ansätze 1 mM Chanoclavin-I, 1 μ g ChaDH-His₆ und 0, 0,15, 0,3, 0,5, 0,7, 1, 1,5, 3, 5 und 10 mM NAD⁺. Die Inkubation erfolgte jeweils für 10 min bei 37 °C.

3.5.6.11 Reaktionsansätze zur Isolierung des enzymatischen Produkts mit ChaDH-His₆

Für die Isolierung des enzymatischen Produkts zur Strukturaufklärung wurde ein 20 ml Ansatz mit 2 mg ChaDH-His₆ durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 3 h bei 37 °C. Anschließend wurde der Ansatz mit Natriumcarbonat auf pH 9 eingestellt und zweimal mit 2 Vol. Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bei einer Wasserbadtemperatur von 32 °C bis zur Trockene eingengt, der Rückstand in 400 μ l Methanol aufgenommen und die Substanzen mittels HPLC isoliert.

3.6 Isolierung von Sekundärstoffen aus Ascomyceten

3.6.1 Extraktion der Kulturüberstände von *Arthroderma benhamiae*

Der *A. benhamiae*-Stamm CBS 112371 wurde von Christoph Heddergott (Arbeitsgruppe Prof. Brakhage, HKI, Jena) unter folgenden Bedingungen kultiviert:

- SG, MAT und Malz: Schüttelkultur für 48 h und 96 h
- SG, KER und HA: Standkultur für 48 h und 96 h

SG: Sabouraud 2 % (w/v) Glukose Broth (Merck, Germany)

MAT: 10 % (v/v) SG, 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/l KH_2PO_4

Malz: 30 g/l Malzextrakt (BD), 3 g/l Soytone (Difco)

KER: 10 g/l Keratin (Paninkret, Germany), 20 mM Kalziumphosphatpuffer pH 5.5 (aus $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$), 0,4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 77 mM NaCl, 5 mM Glukose

HA: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit Keratinozyten

Die Extraktion der Kulturüberstände mit Ethylacetat erfolgte einmal vor und einmal nach der Alkalisierung auf pH 8,5 mit 1 M Natriumcarbonat. Die Überstände wurden dazu zweimal mit 2 Vol. Ethylacetat ausgeschüttelt, die Ethylacetatphasen vereint und zur Trockene eingengt. Das Pellet wurde in 100 μl (Standkulturen) bzw. 500 μl (Schüttelkulturen) Methanol resuspendiert und mittels DC (Kapitel 3.7.2) und HPLC (Kapitel 3.7.1) analysiert.

3.6.2 Isolierung von (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A

Zur Isolierung von (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A wurde ein Extrakt von *P. commune* NRRL 2033 durch Säulenchromatographie über eine Sephadex LH-20 Säule mit Methanol aufgetrennt (Durchmesser: 1,5 cm, Länge: 12 cm). Die Elution erfolgte in Fraktionen mit einem Volumen von je 500 μl . Die Fraktionen wurden mittels DC (Kapitel 3.7.2) auf das Vorhandensein von (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A untersucht und entsprechend vereint. Die Proben wurden in einer Vakuumzentrifuge zur Trockene eingengt und das Pellet in 50 μl Methanol aufgenommen. Je 2 μl der Proben wurden mittels HPLC (Kapitel 3.7.1) analysiert.

3.7 Instrumentelle Analytik niedermolekularer Substanzen

3.7.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

3.7.1.1 Geräte und Säulen

Zur Analytik und Isolierung niedermolekularer Substanzen dienten HPLC-Anlagen (1200 series) der Firma Agilent (Böblingen). Zu analytischen Zwecken erfolgte die Trennung bei einer Flussrate von 1 ml/min über eine Multospher RP-18-Säule (250 mm x 4 mm, Partikelgröße 5 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe), der eine mit Multoprep RP-18 gefüllte Vorsäule (30 mm x 4 mm, Partikelgröße 40 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) vorgeschaltet war. Für die präparative Isolierung erfolgte die Trennung bei einer Flussrate von 2,5 ml/min über eine Multospher RP-18-Säule (250 mm x 10 mm, Partikelgröße 5 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe), der eine mit Multoprep RP-18 gefüllte Vorsäule (50 mm x 10 mm, Partikelgröße 40 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) vorgeschaltet war. Die Detektion erfolgte mit einem Photodioden-Array-Detektor bei einer Wellenlänge von 282 bzw. 296 nm.

3.7.1.2 Analytik der verschiedenen Reaktionsansätze und der Extrakte von *Arthroderma benhamiae*

Die Analyse der Reaktionsansätze erfolgte mit einem Gradienten für eine bestimmte Zeit, 5 minütigem Waschen mit 100 % B und 5 min Äquilibration auf das Anfangsverhältnis. Als Fließmittel dienten bidest. Wasser mit 0,5 % Trifluoressigsäure (TFA) (Fließmittel A) und Acetonitril bzw. Methanol mit 0,5 % TFA (Fließmittel B).

Gradient:

- Reaktionsansätze mit His₈-FgaPT2: in 15 min von 50 auf 100 % B, B= Methanol mit 0,5 % TFA
- Reaktionsansätze mit His₆-FgaPT1: in 30 min von 25 auf 80 % B, B = Methanol mit 0,5 % TFA
- Reaktionsansätze mit (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A: in 10 min von 50 auf 80 % B, dann in 5 min von 80 auf 100 % B, B = Methanol mit 0,5 % TFA
- Reaktionsansätze mit DMA-L-Abrin und FgaDH-His₆: in 15 min von 35 % auf 95 %, B = Methanol mit 0,5 % TFA
- Alle weiteren Reaktionsansätze sowie Analyse der Extrakte von *A. benhamiae*: 8 min 25 % B, dann erst in 20 min von 25 % auf 35 % B, B = Acetonitril mit 0,5 % TFA

3.7.1.3 Isolierung der enzymatischen Produkte der verschiedenen Reaktionen

Die Isolierung des enzymatischen Produkts mit FgaDH-His₆ bzw. ChaDH-His₆ erfolgte mit dem gleichen Programm, das für die analytische Säule verwendet wurde. Sowohl der Produktpeak als auch der verbliebene Substratpeak wurden isoliert, bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in 3 ml verdünntem Ammoniumhydroxid bzw. Natriumcarbonat (pH 9) gelöst. Es wurde zweimal mit 1 Vol. Chloroform extrahiert, die organischen Phasen vereint und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Filtrat wurde zur Trockene eingengt.

Die Isolierung des enzymatischen Produkts mit FgaOx3-His₆ erfolgte mit einem Gradienten von 25 % auf 42 % B in 28 min (B = Acetonitril mit 0,5 % TFA). Der Produktpeak wurde isoliert und bis zur Trockene eingengt.

Die Isolierung des enzymatischen Produkts mit FgaOx3-His₆ und FgaFS-His₆ erfolgte mit einem Gradienten von 36 % auf 45 % B in 28 min (B = Acetonitril mit 0,5 % TFA). Der Produktpeak wurde isoliert, bis zur Trockene eingengt und der Rückstand jeweils in 3 ml verdünntem Ammoniumhydroxid (pH 9,0) gelöst. Es wurde zweimal mit 1 Vol. Chloroform extrahiert, die organischen Phasen vereint und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Filtrat wurde zur Trockene eingengt.

3.7.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die stationäre Phase war Kieselgel 60 F₂₅₄, die mobile Phase für die Analyse der Fraktionen auf (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A war Aceton:Methanol:Ethylacetat in einem Verhältnis von 1:1:1. Die mobile Phase für die Analyse der Extrakte von *A. benhamiae* war CHCl₃/MeOH/NH₄OH in einem Verhältnis von 80:20:0.2. Die Visualisierung erfolgte durch aufeinanderfolgendes Besprühen mit van Urk-Reagenz (1,25 mg/ml *p*-Dimethylaminobenzaldehyd, 0,1 mg/ml FeCl₃ in 65 % (v/v) Schwefelsäure) und 1 % (w/v) NaNO₂-Lösung. Die Ergotalkaloide gehen eine blau-violette Farbreaktion mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd ein, die bei Tageslicht detektierbar ist.

3.7.3 Massenspektrometrie (MS)

Die ESI- und HR-ESI-Messungen wurden größtenteils von Dr. Laufenberg an einem AutoSpec-Gerät der Firma Micromass Co. UK Ltd (jetzt Bruker) durchgeführt.

Das HR-ESI-MS-Spektrum wurde von Dr. Steinbach an einem THERMO LTQ-FT Spektrometer mit einer Injektionsflussrate von 20 µl/min gemessen. Die Deuterium-

Austausch-Masse wurde bestimmt, in dem die Probe in Methanol-D4 gelöst wurde. Die Spektren wurden mit dem Programm XCALIBUR analysiert.

3.7.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Zur Strukturaufklärung mittels NMR-spektroskopischer Analysen wurden die Proben über Nacht im Gefriertrockner getrocknet und in deuteriertem Lösungsmittel (Eurisotop) aufgenommen. Das Lösungsmittelsignal diente auch zur Kalibrierung der chemischen Verschiebungen.

Die NMR-Messungen wurden größtenteils von Dr. Xie durchgeführt. Die Spektren wurden bei 300 K an einem Bruker AVANCE-600 Spektrometer und das ^{13}C -Spektrum an einem Bruker DRX-400 Spektrometer aufgenommen. Die Daten wurden mit der Bruker Software TOPSPIN 2.1 ausgewertet.

Die NMR-Messungen durch Dr. Kämpchen erfolgten an einem JEOL ECA-500 Spektrometer (JEOL, München).

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Ergotalkaloidbiosynthese in Pilzen der Familie Trichocomaceae

4.1.1 Charakterisierung der Chanoclavin-I-Dehydrogenase FgaDH aus *Aspergillus fumigatus*

4.1.1.1 Klonierung des Gens *fgaDH* aus *Aspergillus fumigatus* B5233

Das hypothetische Gen *fgaDH* (früher als *fgaOx2* bezeichnet, mit dem GenBank Eintrag AFUA_2G18000) aus *A. fumigatus* Af293 besteht aus zwei Exons mit einer Länge von 589 bzw. 197 bp, die durch ein Intron mit einer Länge von 67 bp unterbrochen werden. Das abgeleitete Genprodukt FgaDH (EAL94099.1) umfasst 261 Aminosäuren und besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 27,8 kDa. FgaDH weist eine Sequenzidentität von 66 % mit EasD aus *C. purpurea* (CAB39316.1) (Schardl *et al.*, 2006) bzw. 65 % mit EasD aus *C. fusiformis* (ABV57822.1) auf.

FgaDH wurde zwar bereits als Short-Chain Dehydrogenase/Reduktase (SDR) vorausgesagt (Schardl *et al.*, 2006; Unsöld & Li 2005), jedoch konnte dem Enzym bisher keine Rolle in der Biosynthese von Ergotalkaloiden zugewiesen werden. SDRs sind eine große Protein-Familie, die aus mindestens 140 verschiedenen Enzymen besteht (Kavanagh *et al.*, 2008). Die Mitglieder der Familie besitzen typischerweise eine Peptidkettenlänge von etwa 250 Aminosäuren (Jörnvall 2008). SDRs sind NAD⁺- oder NADP⁺-abhängig und verantwortlich für die Katalyse verschiedener Reaktionen, u.a. die Oxidation eines Alkohols (Kavanagh *et al.*, 2008). Der Großteil der SDRs sind Homodimere oder Homotetramere (Kavanagh *et al.*, 2008). Die Analyse der Sequenz von FgaDH ergab, dass die beiden für klassische SDRs typischen Sequenzmotive, TGXXX[AG]XG für die Bindung des Kofaktors NAD(P) und YXXXX mit einem Serin stromaufwärts für die Bindung des Substrats, vorhanden sind (Kavanagh *et al.*, 2008; Oppermann *et al.*, 1997). Im Fall von FgaDH sind dies TGGASGIG (Aminosäure 12–19) und YGTSK (Aminosäure 166–170) mit S153.

Die Amplifikation des Gens *fgaDH* mit dem mutiertem Stopcodon aus cDNA von *A. fumigatus* B5233, die Ligation in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy und die Transformation von *E. coli* mit dem Plasmid war bereits durch Marco Matuschek erfolgt. Das Stopcodon war dabei für die spätere Aufreinigung mittels Histidin-tag während der Amplifikation durch den Primer *fgaDH_rev* mutiert worden.

Es folgte die Isolierung von Plasmid-DNA aus mehreren Klonen und die Überprüfung der Plasmide durch verschiedene Restriktionsenzyme. Nach Bestätigung der Gensequenz durch die Sequenzierung eines positiven Klon wurde das Plasmid als pCW01 bezeichnet. Die Sequenzierung ergab, dass die Exon-Sequenzen von *fgaDH* aus dem hier verwendeten *A. fumigatus*-Stamm B5233 mit den Sequenzen von *fgaDH* des sequenzierten *A. fumigatus*-Stamm Af293 zu 100 % identisch waren. Die codierende Sequenz von *fgaDH* aus *A. fumigatus* B5233 wurde unter dem Eintrag GQ413954 in der GenBank hinterlegt.

Um das Expressionskonstrukt pCW03 zu erhalten, wurde das Gen mit *NcoI* und *BamHI* mittels partieller Restriktion aus pCW01 herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pQE-60 kloniert. Die partielle Restriktion war notwendig, da zusätzlich zu den zwei nah beieinander liegenden *NcoI*-Schnittstellen in der *multiple cloning site* (MCS) des Klonierungsvektors pGEM-T Easy eine *NcoI*-Schnittstelle in der Sequenz von *fgaDH* vorlag (Abbildung 4-1A). Bei dem kompletten Verdau mit *NcoI* und *BamHI* lag das Insert in zwei Fragmenten mit Längen von 523 und 262 bp vor (Abbildung 4-1B). Durch die partielle Restriktion mit *NcoI* für 30 sek konnten zusätzlich Fragmente mit einer Länge von 785 bp erhalten werden. Diese entsprachen dem Insert, das mittels *NcoI* und *BamHI* aus dem Klonierungsvektor geschnitten, aber nicht intern durch *NcoI* geschnitten wurde. Das Fragment mit der richtigen Länge wurde über Gelextraktion aufgereinigt und mit dem ebenfalls zuvor geschnittenen Expressionsvektor ligiert.

Es musste berücksichtigt werden, dass durch die unvollständige Restriktion und die zusätzliche *NcoI*-Schnittstelle im Klonierungsvektor auch Fragmente erhalten wurden, die dem Insert mit einem 26 bp langen Vektorstück entsprachen. Da durch den geringen Längenunterschied von 26 bp die Fragmente ohne (785 bp) bzw. mit diesem Stück (811 bp) im Agarosegel nicht aufgetrennt werden konnten, wurde die Plasmid-DNA nach der Ligation zur Kontrolle mit *NotI* inkubiert. Mit *NotI* konnte die Plasmid-DNA nur linearisiert werden, wenn das kurze Stück aus dem Klonierungsvektor mit in den Expressionsvektor kloniert wurde. Eine *NotI*-Schnittstelle war nur in dem Stück aus dem Vektor vorhanden, jedoch nicht im Gen oder dem Expressionsvektor (Abbildung 4-1A). Da keine Linearisierung von pCW03 mit *NotI* stattfand, lag das Stück aus dem Klonierungsvektor in pCW03 nicht vor.

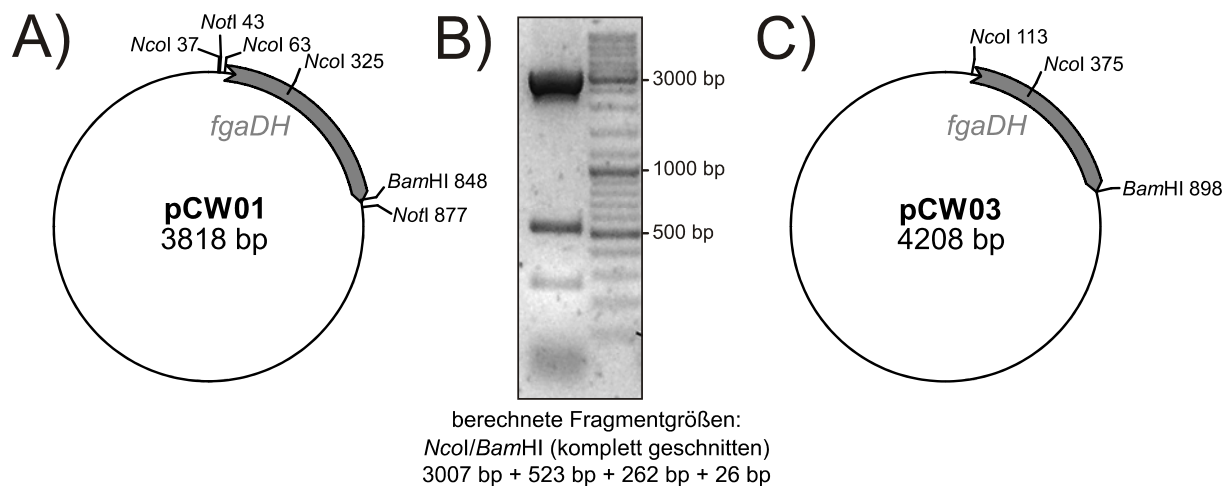


Abbildung 4-1: A) Klonierungskonstrukt pCW01 (*fgaDH* in pGEM-T Easy), B) Agarosegel zu der kompletten Restriktion von pCW01 mit *NcoI* und *BamHI* und C) Expressionskonstrukt pCW03 (*fgaDH* in pQE-60). Dargestellt sind die für die Umklonierung in den Expressionsvektor wichtigen Restriktionsschnittstellen.

4.1.1.2 Expression des Gens *fgaDH* aus *Aspergillus fumigatus* B5233

Die Expression des Gens erfolgte in *E. coli* XL1-Blue MRF' Zellen mit 0,1 mM IPTG bei 37 °C für 4 h, da bei längerer Induktion der Großteil der Zellen in die Lyse ging. Nach der Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose konnten 16 mg FgaDH-His₆ aus einem Liter Kultur erhalten werden. Die gelelektrophoretische Analyse (Abbildung 4-2) zeigte für das Protein unter denaturierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von etwa 30 kDa, das dem theoretischen Molekulargewicht von FgaDH-His₆ entspricht.

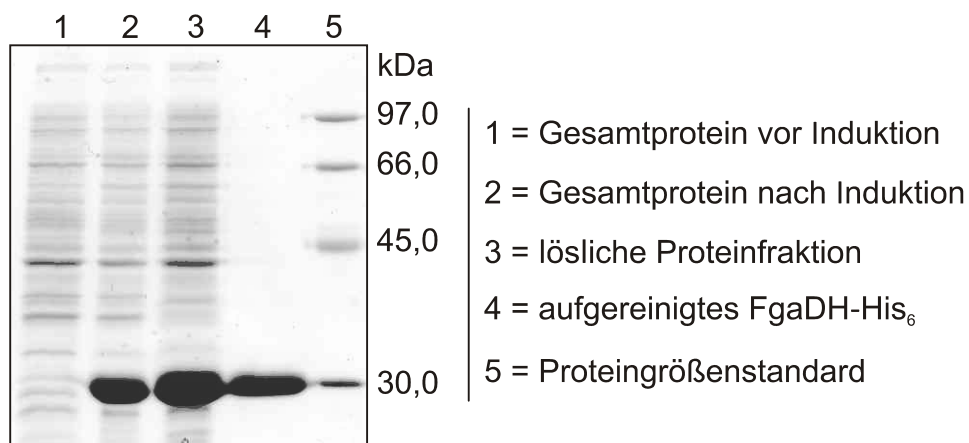


Abbildung 4-2: SDS-PAGE der Aufreinigung von FgaDH-His₆. Es wurde ein 12 % Trenngel verwendet.

4.1.1.3 Aktivitätstests mit FgaDH-His₆

Da zu Beginn nicht bekannt war, an welcher Stelle im Biosyntheseweg FgaDH einzuordnen ist, wurden die Substanzen aus dem Biosyntheseweg als Substrate verwendet, die entweder hergestellt werden konnten oder bereits vorhanden waren. Um zu untersuchen, ob FgaDH an der Reaktion von DMA-L-Abrin zu Chanoclavin-I beteiligt ist, musste das Substrat DMA-L-Abrin zuerst mit Hilfe von FgaPT2 aus L-Abrin hergestellt werden. Die Umsetzung erfolgte zu 99,9 % (Abbildung 4-3).

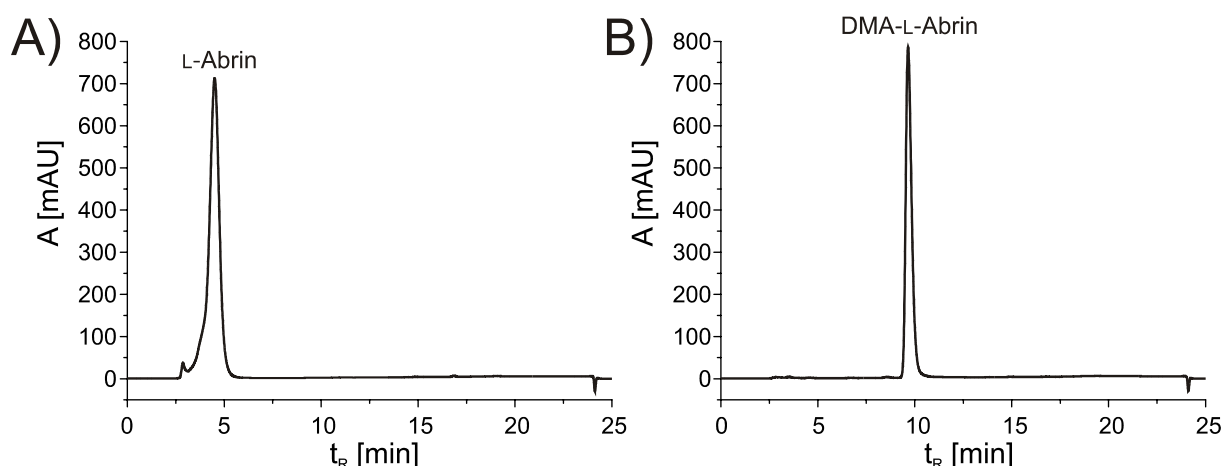


Abbildung 4-3: HPLC-Chromatogramme zu der Umsetzung von L-Abrin zu DMA-L-Abrin. A) L-Abrin Standard, B) Reaktionsansatz mit L-Abrin und FgaPT2.

Die Inkubation von DMA-L-Abrin erfolgte dann mit FgaDH-His₆ und den Oxidationsmitteln NAD⁺, NADP⁺, FAD und FMN. Bei keinem der Reaktionsansätze hat eine Umsetzung des DMA-L-Abrin zu Chanoclavin-I oder einem anderen Produkt durch FgaDH stattgefunden.

Daraufhin wurde Chanoclavin-I, das freundlicherweise von Prof. Leistner zur Verfügung gestellt wurde, als Substrat getestet. Da die Reaktion von Chanoclavin-I zu dem möglichen Intermediat Chanoclavin-I-Aldehyd eine Oxidation darstellt, wurden als Kofaktoren die Oxidationsmittel NAD⁺, NADP⁺, FAD und FMN verwendet. Die Inkubation von FgaDH-His₆ erfolgte jeweils mit 1 mM Chanoclavin-I und 5 mM von einem der Kofaktoren. Die Analyse der Reaktionsansätze nach 16-stündiger Inkubation bei 37 °C erfolgte mittels HPLC. Wie in Abbildung 4-4A zu sehen, konnte bei dem Reaktionsansatz mit NAD⁺ zusätzlich zu dem Substratpeak (1) bei 8,7 min ein Peak (2) mit einer Retentionszeit von 11,6 min detektiert werden. Dieser Peak ist nicht in dem Reaktionsansatz mit zuvor Hitze-inaktiviertem FgaDH (Abbildung 4-4B) oder ohne NAD⁺ vorhanden (Abbildung 4-4C). Auch die Inkubationen mit NADP⁺, FAD oder FMN als Protonenakzeptoren führten zu keiner detektierbaren Produktbildung, so dass die Reaktion strikt von NAD⁺ abhängig ist.

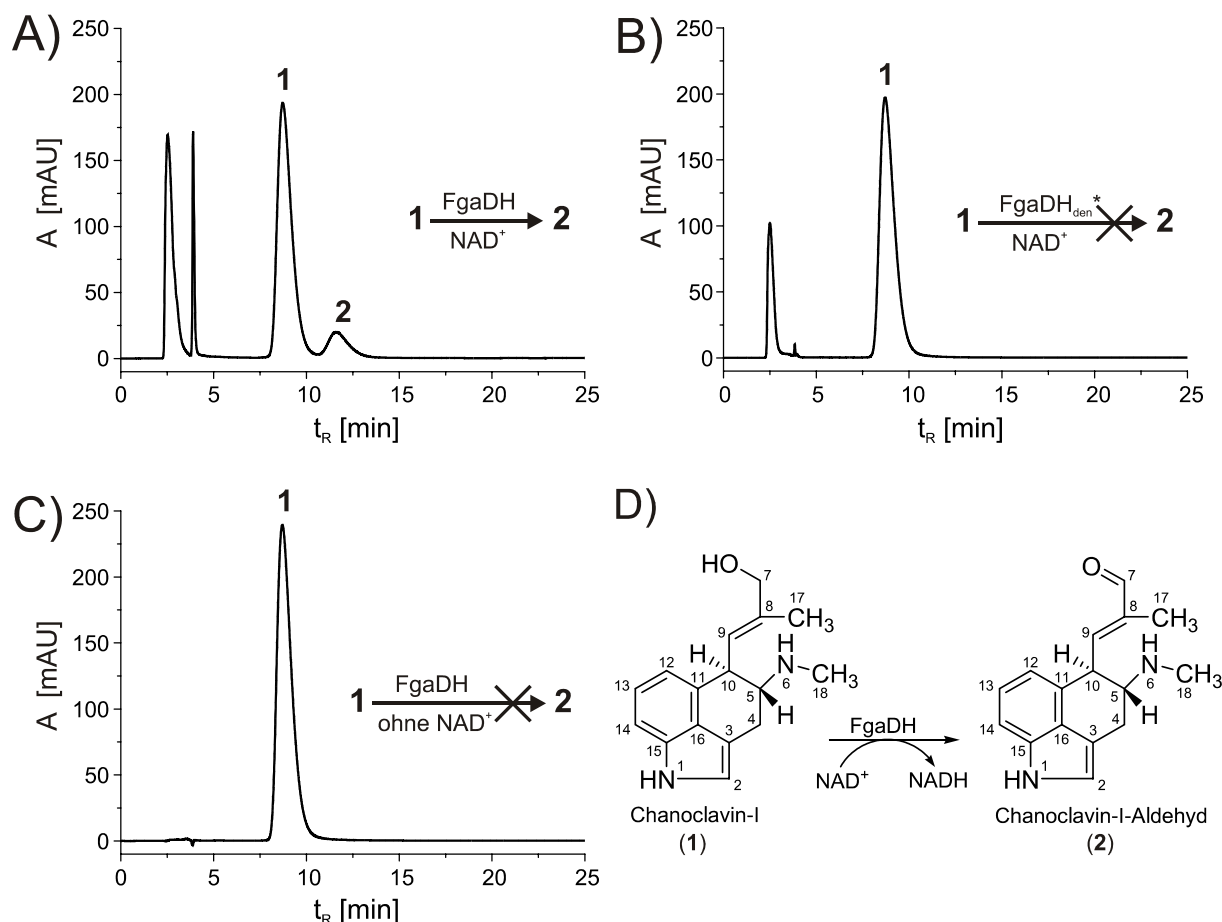


Abbildung 4-4: HPLC-Chromatogramme der Inkubationsgemische von Chanoclavin-I A) mit FgaDH-His₆ in Anwesenheit von NAD⁺, B) mit Hitze-inaktiviertem FgaDH-His₆ in Anwesenheit von NAD⁺ und C) mit FgaDH-His₆ in Abwesenheit von NAD⁺. D) Die Reaktion von Chanoclavin-I zu Chanoclavin-I-Aldehyd mit einer Nummerierung der Grundgerüste. Die Reaktionsansätze enthielten 1 mM Chanoclavin-I, 5 mM NAD⁺ und 5 µg FgaDH-His₆. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 16 h. Die Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 296 nm aufgenommen. (1: Chanoclavin-I, 2: Chanoclavin-I-Aldehyd, _{den}^{*}: das Protein wurde für 30 min bei 100 °C denaturiert)

Da selbst nach einer Inkubation von 16 h mit 5 µg Protein nur eine Umsetzung von maximal 16 % stattfand, wurde versucht, den Umsatz zu optimieren. Untersuchungen zur Stabilität des Proteins zeigten, dass das Protein bereits nach einer 4-stündigen Inkubation bei 37 °C keine Aktivität mehr zeigte. Für den Test wurde FgaDH in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 für unterschiedliche Zeiten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden Chanoclavin-I und NAD⁺ zugegeben und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Je länger FgaDH zuvor bereits bei 37 °C inkubiert wurde, umso weniger Produktbildung fand in den nachfolgenden Reaktionsansätzen statt. Im Reaktionsansatz mit 4-stündig inkubiertem FgaDH war bereits keine Produktbildung mehr detektierbar. Daher wurde versucht, den Umsatz zu erhöhen, indem nach 4 h Inkubation noch einmal zusätzliches Protein zugegeben wurde. Dies führte jedoch zu keiner Erhöhung des Umsatzes. Auch die Menge an NAD⁺ war nicht der limitierende Faktor,

da der Umsatz ungefähr gleich blieb, auch wenn nach der Hälfte der Inkubationszeit neues NAD^+ zugegeben wurde. Die Veränderung der Inkubationstemperatur von 37 °C auf 25 °C, 30 °C oder 33 °C hatte ebenfalls keine signifikante Auswirkung auf den Umsatz.

4.1.1.4 Strukturaufklärung des enzymatischen Produkts mit FgaDH-His₆

Für die Isolierung wurde ein 20 ml Reaktionsansatz mit 2 mg FgaDH-His₆ angesetzt und 4 h inkubiert. Damit konnte ein Umsatz von 27 % erreicht werden. Die Isolierung des Produkts und des nicht umgesetzten Substrats erfolgte mittels HPLC. Die Strukturen des Substrats und Produkts wurden mit spektroskopischen Methoden (MS sowie ¹H-NMR und H-H-COSY) aufgeklärt.

Sowohl für Chanoclavin-I als auch für Chanoclavin-I-Aldehyd standen bereits NMR-Daten zur Verfügung (Maier *et al.*, 1980; Naidoo *et al.*, 1970; Stauffacher & Tschertter 1964). Aufgrund der geringeren Auflösung der NMR-Spektren zur damaligen Zeit konnten einige Signale jedoch nicht eindeutig den entsprechenden Protonen zugeordnet werden. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass Chanoclavin-I und Chanoclavin-I-Aldehyd in zwei Formen existieren kann, d.h. entweder als freie Base oder an N-6 protoniert. Die chemischen Verschiebungen der Protonen dieser zwei Formen unterscheiden sich eindeutig voneinander, wie bereits bei Ergotalkaloiden beobachtet wurde (Liu *et al.*, 2009; Unsöld & Li 2005). Da das Substrat und Produkt durch die Isolierung mit 0,5 % TFA in den HPLC-Lösungsmitteln in protonierter Form vorlagen, mussten sie zum Vergleich der NMR-Daten durch Deprotonierung in die freie Base überführt werden.

Die ¹H-NMR-Spektren sowie die H-H-COSY-Spektren des Produkts und des Substrats befinden sich im Anhang (Abbildung 7-1 und Abbildung 7-2). Bei den ¹H-NMR-Spektren wurde das Lösungsmittelsignal von CDCl_3 bei 7,24 ppm als Referenz verwendet. Die Nummerierung der Grundgerüste des Produkts und des Substrats ist in Abbildung 4-4 dargestellt. Mit Hilfe der H-H-COSY-Spektren konnten alle Signale in den ¹H-NMR-Spektren von Substrat und Produkt den entsprechenden Protonen zugeordnet werden (Tabelle 4-1).

Der Vergleich des ¹H-NMR-Spektrums des enzymatischen Produkts mit dem des Substrats Chanoclavin-I zeigt, dass das Signal für die beiden Protonen an C-7 von Chanoclavin-I bei 4,16 ppm im Spektrum des Produkts nicht mehr vorhanden ist. Stattdessen erscheint ein Singulett bei 9,47 ppm, das für das Proton einer Aldehydgruppe spricht. Somit ist die Hydroxygruppe an C-7 von Chanoclavin-I zu einer Aldehydgruppe oxidiert worden. Das *double pulse field gradient spin echo* -

nuclear Overhauser Effect (DPFGSE-NOE)-Experiment mit Chanoclavin-I-Aldehyd führte dazu, dass sich durch die selektive Bestrahlung der Methylgruppe an C-8 bei 1,99 ppm nur die Intensität des Signals für H-10 bei 4,38 ppm, nicht aber das Signal für H-9 bei 6,47 ppm erhöhte (Abbildung 7-3 im Anhang). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass H₃-17 und H-10 sich in räumlicher Nähe befinden und die Aldehydgruppe und das olefinische Methinproton in *cis*-Konfiguration zueinander liegen. Hätte dagegen eine *trans*-Konfiguration zwischen der Aldehyd-Gruppe und dem Proton an C-9 vorgelegen, hätte durch die Bestrahlung das Signal für H-9 bei 6,47 ppm an Intensität zunehmen müssen.

Die erhaltenen NMR-Daten stimmen ebenfalls mit denen überein, die zuvor für Chanoclavin-I-Aldehyd veröffentlicht wurden (Kren *et al.*, 1986; Maier *et al.*, 1980). Die Struktur wurde zusätzlich durch die Detektion des [M+1]⁺ Ions bei *m/z* = 255 im positiven ESI-MS-Spektrum bestätigt (Abbildung 7-4 im Anhang). Durch die spektroskopischen Methoden konnte die Struktur des Substrats somit eindeutig als Chanoclavin-I bestätigt und das Produkt als Chanoclavin-I-Aldehyd identifiziert werden.

Tabelle 4-1: ¹H-NMR-Daten für Chanoclavin-I und Chanoclavin-I-Aldehyd aus dem Inkubationsgemisch mit FgaDH in CDCl₃.

Position	δ _H [ppm] Multiplizität (J [Hz])	
	Chanoclavin-I	Chanoclavin-I-Aldehyd
1	7,91 brs	8,02 brs
2	6,90 brs	6,98 brs
4	3,29 dd (15,1; 4,0)	3,28 dd (15,3; 4,0)
	2,75 ddd (15,1; 7,2; 1,2)	2,94 ddd (15,3; 7,0; 0,9)
5	2,93, dt (8,7; 4,0)	3,21 m
6	3,64 m	3,64 m
7	4,16 brs	9,47 s
9	5,43 dq (9,9; 1,3)	6,47 dq (10,0; 1,3)
10	3,95 brt (8,7)	4,38 brt (7,5)
12	6,73 d (7,0)	6,72 d (7,2)
13	7,11 dd (7,5; 7,0)	7,13 dd (7,5; 7,2)
14	7,18 d (7,5)	7,24 d (7,5)
17	1,88 d (1,3)	1,99 d (1,3)
18	2,51 s	2,53 s

4.1.1.5 Biochemische Eigenschaften von FgaDH-His₆ und Bestimmung der kinetischen Parameter

Mittels Größenausschlusschromatographie konnte das Molekulargewicht von FgaDH-His₆ in seinem nativen Zustand als 118 kDa bestimmt werden. Das weist darauf hin, dass das Protein in seiner aktiven Form genau wie viele andere klassische SDRs als Homotetramer vorliegt. Die Produktbildung bei einem 100 µl Reaktionsansatz befindet sich bis 3 µg Protein bzw. 20 min Inkubationszeit im linearen Bereich (Abbildung 4-5).

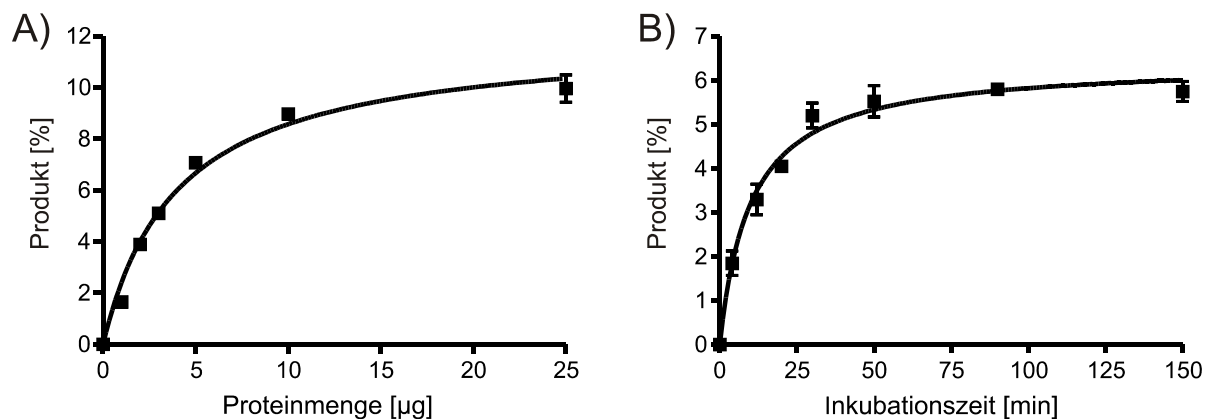


Abbildung 4-5: Abhängigkeit der Produktbildung der FgaDH-Reaktion von A) der Proteinmenge und B) der Inkubationszeit. Die Reaktionsansätze (100 µl) enthielten 1 mM Chanoclain-I, 5 mM NAD⁺ und A) unterschiedliche Mengen FgaDH-His₆ mit einer Inkubationszeit von 15 min bzw. B) 1 µg FgaDH-His₆ mit variierenden Inkubationszeiten.

Da die von FgaDH katalysierte Reaktion anscheinend der Michaelis-Menten Kinetik folgt, konnten die K_M -Werte anhand der Hanes-Woolf Diagramme bestimmt werden (Abbildung 4-6). Der K_M -Wert für Chanoclain-I liegt bei 0,27 mM und der für NAD⁺ bei 1,1 mM. Der Mittelwert aus den beobachteten maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (v_{max}) betrug 186 nmol min⁻¹ mg⁻¹. Das entspricht einer Wechselzahl (k_{cat}) von 0,38 s⁻¹.

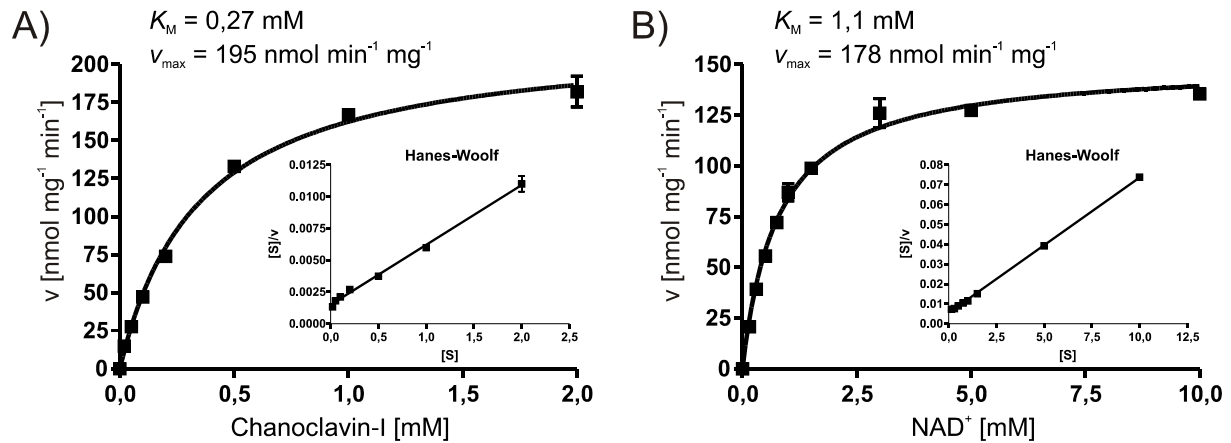


Abbildung 4-6: Bestimmung der kinetischen Parameter der von FgaDH katalysierten Reaktion mit Hilfe des Hanes-Woolf Diagramms für A) Chanoclain-I und B) NAD⁺.

Um die Ionenabhängigkeit der Reaktion zu testen, wurde Chanoclain-I mit FgaDH-His₆ und NAD⁺ in Anwesenheit von EDTA oder verschiedenen Metallionen inkubiert (Abbildung 4-7). Der Reaktionsansatz ohne Metallionen bzw. EDTA diente als Kontrolle und entsprach 100 % relativer Aktivität. In Anwesenheit von EDTA wurden 48 % der Aktivität der Kontrolle detektiert, was auf eine mögliche Beteiligung von Metallionen in der Reaktion schließen lässt. Die Zugabe von Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺ bzw. Na⁺ zu dem Reaktionsansatz führte jedoch zu keiner signifikanten Änderung der Enzym-Aktivität im Vergleich zu der Kontrolle. Nach Zugabe von Mn²⁺ wurden 73 % der Kontroll-Aktivität detektiert. Eine sehr viel geringere relative Aktivität von ungefähr 20 bis 25 % wurde durch die Inkubation mit Fe²⁺, Co²⁺, Zn²⁺ bzw. Ni²⁺ erhalten.

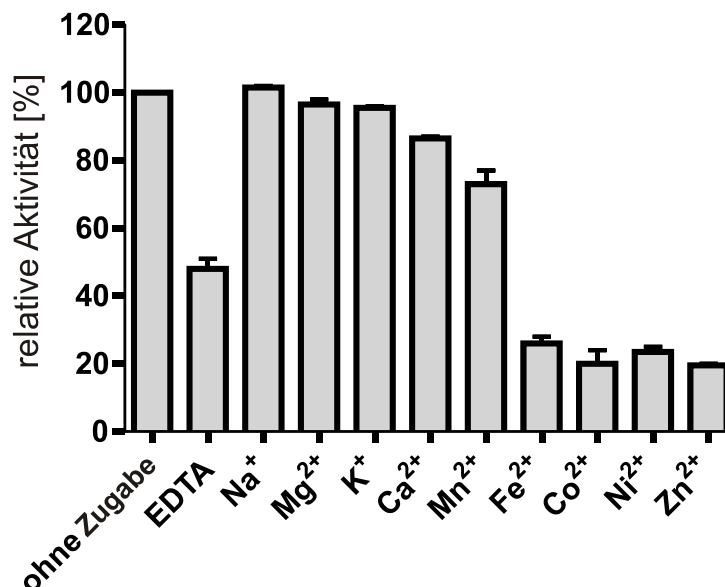


Abbildung 4-7: Graphische Darstellung der Ionenabhängigkeit der FgaDH-Reaktion.

4.1.2 Charakterisierung des *Old Yellow Enzyme* FgaOx3 aus *Aspergillus fumigatus*

4.1.2.1 Klonierung des Gens *fgaOx3* aus *Aspergillus fumigatus* B5233

Das hypothetische Gen *fgaOx3* (Eintrag AFUA_2G17960 in der GenBank) aus *A. fumigatus* Af293 besteht aus einem Exon mit einer Länge von 1131 bp. Das abgeleitete Genprodukt FgaOx3 (EAL94095.1) umfasst 376 Aminosäuren und besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 42,2 kDa.

Das Plasmid pMM004 von Marco Matuschek, das die Sequenz von *fgaOx3* mit dem unmutierten Stop-Codon in pGEM-T Easy enthält, wurde in dieser Arbeit als Template für die Amplifikation der Sequenz von *fgaOx3* mit mutiertem Stop-Codon verwendet. Die Aufreinigung des 1147 bp langen PCR-Produkts erfolgte mittels Gelextraktion. Es folgte die Ligation in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy, die Transformation von *E. coli* und die Isolierung von Plasmid-DNA aus mehreren Klonen. Nach der Überprüfung der Plasmid-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen wurde ein positiver Klon sequenziert und als Plasmid pCW02 bezeichnet.

Die Sequenzierung ergab, dass sich die Sequenz von *fgaOx3* aus *A. fumigatus* B5233 und die Sequenz von *fgaOx3* aus *A. fumigatus* Af293 an 9 Stellen unterscheiden. Dabei liegen an 8 Stellen Punktmutationen und an einer Stelle ein zusätzliches Triplet vor. Die Unterschiede in der Nukleotid-Sequenz führen zu 5 ausgetauschten und einer zusätzlichen Aminosäure (Abbildung 4-8). Die Unterschiede kamen nicht durch Fehler bei der Sequenzierung zustande, da die Unterschiede bei drei untersuchten Klonen vorlagen. Die codierende Sequenz von *fgaOx3* aus *A. fumigatus* B5233 wurde unter dem Eintrag GU929211 in der GenBank hinterlegt. FgaOx3 aus *A. fumigatus* B5233 weist eine Sequenzidentität von 56 % mit EasA aus *C. purpurea* (CAG28312.1) (Schardl *et al.*, 2006) und EasA aus *C. fusiformis* (ABV57819.1) auf.

			20			40			
A.f. B5233	MREEPSSAQL	FKPLKVGRCH	LQHRMIMAPT	TRFRADGQGV	PLPFVQEYY	S	50		
A.f. Af293	MREEPSSAQL	FKPLKVGRCH	LQHRMIMAPT	TRFRADGQGV	PLPFVQEYY	G	50		
	60			80		100			
A.f. B5233	QRASVPGTLL	ITEATDITPK	AMGYKHVPGI	WSEPQREAWR	EIVSRVHSKK		100		
A.f. Af293	QRASVPGTLL	ITEATDITPK	AMGYKHVPGI	WSEPQREAWR	EIVSRVHSKK		100		
		120		140					
A.f. B5233	CFIFCQLWAT	GRAADPDVLA	DMKKDLISSS	AVPVEEKGPL	PRALTEDEIQ		150		
A.f. Af293	CFIFCQLWAT	GRAADPDVLA	DMK-DLISSS	AVPVEEKGPL	PRALTEDEIQ		149		
	160		180		200				
A.f. B5233	QYIADFAHAA	RNAINAGFDG	VEIHGANGYL	IDQFTQKSCN	HRQDRWGGSI		200		
A.f. Af293	QCIADFAQAA	RNAINAGFDG	VEIHGANGYL	IDQFTQKSCN	HRQDRWGGSI		199		
		220		240					
A.f. B5233	ENRARFAVEV	TRAVIEAVGA	DRVGKLSPY	SQYLGMTMD	ELVPQFEYLI		250		
A.f. Af293	ENRARFAVEV	TRAVIEAVGA	DRVGKLSPY	SQYLGMTMD	ELVPQFEYLI		249		
	260		280		300				
A.f. B5233	AQMRRLDVAY	LHLANSRWLD	EEKPHDPNH	EVFVRVWGQS	SPILLAGGYD		300		
A.f. Af293	AQMRRLDVAY	LHLANSRWLD	EEKPHDPNH	EVFVRVWGQS	SPILLAGGYD		299		
		320		340					
A.f. B5233	AASAEKVTEQ	MAAATYTNVA	IAFGGYFIST	PDLPFRVMAG	IQLQKYDRAS		350		
A.f. Af293	AASAEKVTEQ	MAAATYTNVA	IAFGRYFIST	PDLPFRVMAG	IQLQKYDRAS		349		
	360								
A.f. B5233	FYSTLSREGY	LNYPFSAEYM	ALHNFPV				377		
A.f. Af293	FYSTLSREGY	LDYPFSAEYM	ALHNFPV				376		

Abbildung 4-8: Aminosäuresequenzvergleich des Proteins FgaOx3 aus *Aspergillus fumigatus* (A.f.) B5233 und *Aspergillus fumigatus* (A.f.) Af293. Die Unterschiede in den zwei Sequenzen sind grau hinterlegt.

Um das Expressionskonstrukt pCW04 zu erhalten, wurde das Gen *fgaOx3* mit einer Länge von 1129 bp mit den Enzymen *SphI* und *BamHI* mittels partieller Restriktion aus pCW02 herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pQE-70 kloniert. Die partielle Restriktion war notwendig, da das Gen *fgaOx3* des hier vorliegenden *A. fumigatus*-Stamms im Gegensatz zu dem vollständig sequenzierten Stamm eine interne *SphI*-Schnittstelle enthielt (Abbildung 4-9). Zusätzlich enthält der Vektor pGEM-T Easy in der MCS zwei *SphI*-Schnittstellen. Dadurch musste für die Umklonierung von *fgaOx3* genauso vorgegangen werden wie bei *fgaDH*.

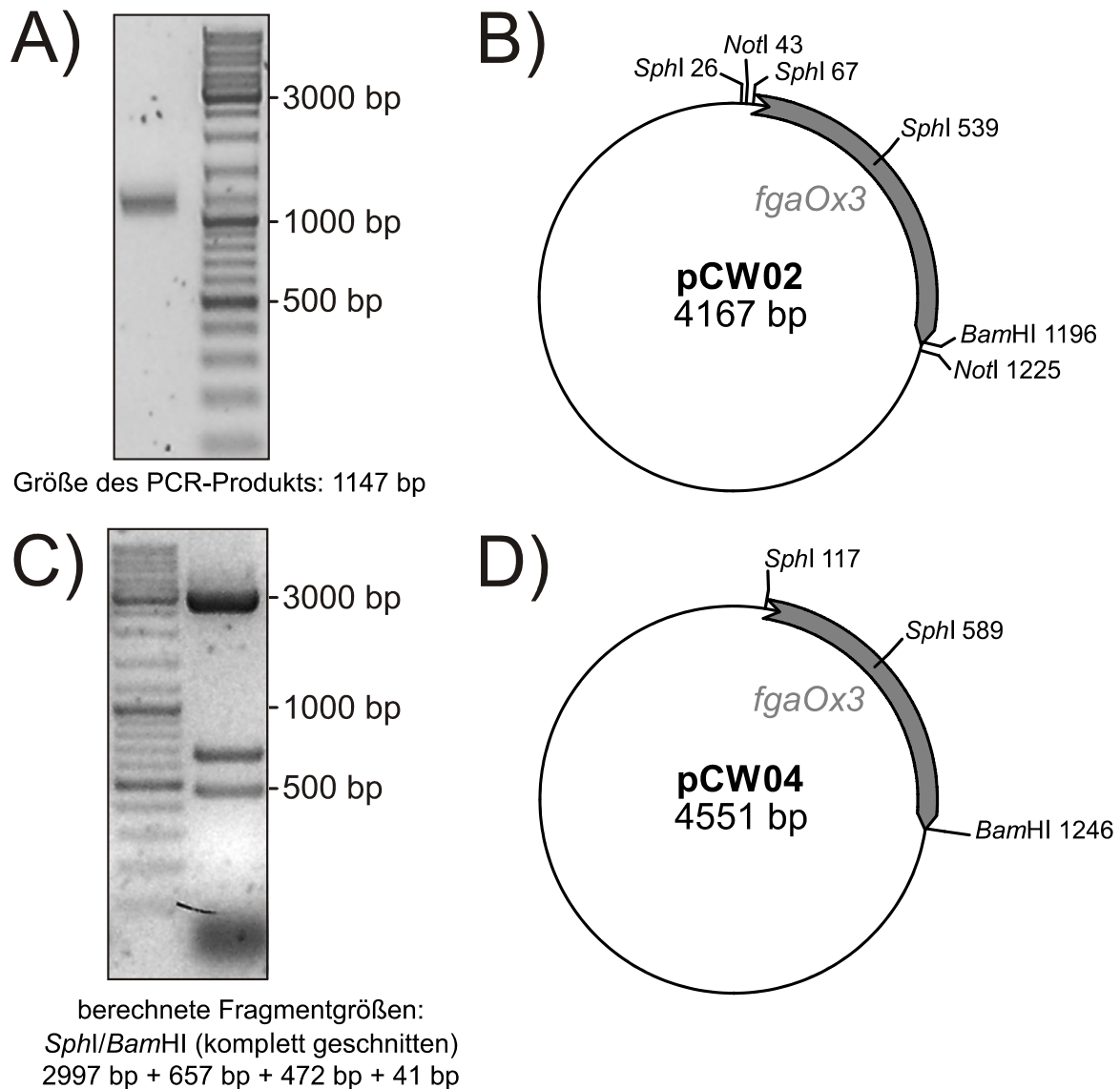


Abbildung 4-9: A) Agarosegel des PCR-Produkts für *fgaOx3* nach der Aufreinigung mittels Gelextraktion B) Klonierungskonstrukt pCW02 (*fgaOx3* in pGEM-T Easy), C) Agarosegel zu der kompletten Restriktion von pCW02 mit *SphI* und *BamHI* und D) Expressionskonstrukt pCW04 (*fgaOx3* in pQE-70). Dargestellt sind die für die Umklonierung in den Expressionsvektor wichtigen Restriktionsschnittstellen.

4.1.2.2 Expression des Gens *fgaOx3* aus *Aspergillus fumigatus* B5233

Die Expression des Gens erfolgte in *E. coli* XL1-Blue MRF' Zellen mit 1,0 mM IPTG für 4 h bei 37 °C. Allerdings lag unter diesen Bedingungen der Großteil des Proteins als Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) vor. Einschlusskörperchen sind Ansammlungen von falsch oder unvollständig gefalteten Proteinen, die bei der heterologen Expression entstehen können. Daher wurde die Expression bei 30 °C wiederholt, wodurch die Zellen langsamer wuchsen und mehr Zeit zur richtigen Faltung der Proteine zur Verfügung gestellt wurde.

Nach der Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose konnten 5 mg FgaOx3-His₆ aus einem Liter Kultur erhalten werden. Die gelelektrophoretische Analyse zeigte für FgaOx3-His₆ unter denaturierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von etwas weniger als 45 kDa, das dem theoretischen Molekulargewicht von 43,5 kD entspricht (Abbildung 4-10). Mittels Größenausschlusschromatographie konnte das Molekulargewicht von FgaOx3-His₆ in seinem nativen Zustand als 46 kDa bestimmt werden. Das weist darauf hin, dass das Protein in seiner aktiven Form als Monomer vorliegt.

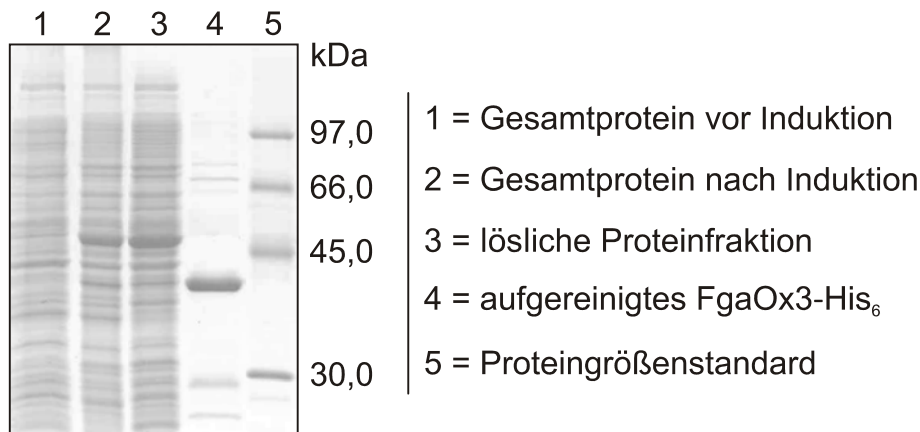


Abbildung 4-10: SDS-PAGE der Aufreinigung von FgaOx3-His₆. Es wurde ein 12 % Trenngel verwendet.

4.1.2.3 Aktivitätstests mit FgaOx3-His₆

Da das Protein FgaOx3 eine *old yellow enzyme-like FMN binding domain* enthält und daher wahrscheinlich flavin-abhängig ist, wurden die ersten Reaktionsansätze mit dem Kofaktor FMN angesetzt. Neben FMN brauchen diese Enzyme ebenfalls NADPH als reduzierenden Kofaktor. Substrate für OYEs sind z.B. Quinone sowie α,β -ungesättigte Aldehyde und Ketone, zu denen auch Chanoclavin-I-Aldehyd zählt. Die Reaktionsansätze wurden zu Beginn als Tandem-Inkubation durchgeführt (Tabelle 4-2), bei der der Reaktionsansatz von Chanoclavin-I mit FgaDH-His₆ und NAD⁺ mit Ethylacetat extrahiert wurde. Nach dem Einengen wurde der Rückstand als Substrat für die zweite Inkubation mit FgaOx3-His₆ verwendet. Das Abstoppen der zweiten Inkubation erfolgte mit 1 Vol. Methanol. Die Analyse der Reaktionsansätze nach 16-stündiger Inkubation bei 30 °C erfolgte mittels HPLC.

Tabelle 4-2: Die Tandeminkubationen mit verschiedenen Kombinationen an FgaOx3 und den Kofaktoren.

1. Inkubation	2. Inkubation	3. Inkubation	Produkt
FgaDH + NAD ⁺	FgaOx3	–	Chanoclavin-I-Aldehyd
FgaDH + NAD ⁺	FgaOx3 + FMN	–	Chanoclavin-I-Aldehyd
FgaDH + NAD ⁺	FgaOx3 + NADH	–	Chanoclavin-I-Aldehyd
FgaDH + NAD ⁺	FgaOx3 + NADH + FMN	–	neuer Produktpeak (3)
FgaDH + NAD ⁺	FgaOx3 + FMN	NADH	Chanoclavin-I-Aldehyd

Anschließend wurden Koinkubationen von FgaOx3 mit Chanoclavin-I, FgaDH und NAD⁺ durchgeführt (Tabelle 4-3). Da in den HPLC-Chromatogrammen der Tandeminkubationen aufgefallen ist, dass die starke Absorption der Kofaktoren störend ist, wurden die Reaktionsansätze nach der Inkubation im Folgenden durch Alkalisierung und anschließende Extraktion mit Ethylacetat abgestoppt. Die Analyse der Reaktionsansätze nach 16-stündiger Inkubation bei 30 °C erfolgte mittels HPLC.

Tabelle 4-3: Die Koinkubationen mit verschiedenen Kombinationen an FgaOx3 und den Kofaktoren.

Koinkubation	Produkt
FgaDH + NAD ⁺ + FgaOx3 + NADH + FMN	neuer Produktpeak (3)
FgaDH + NAD ⁺ + FgaOx3 _{den} + NADH + FMN	Chanoclavin-I-Aldehyd
FgaDH + NAD ⁺ + FgaOx3	Chanoclavin-I-Aldehyd
FgaDH + NAD ⁺ + FgaOx3 + NADH	Chanoclavin-I-Aldehyd
FgaDH + NAD ⁺ + FgaOx3 + FMN	Chanoclavin-I-Aldehyd

Es zeigte sich, dass nur wenn sowohl FMN als auch NADPH im Reaktionsansatz vorlagen, ein breiter, asymmetrischer Peak (3) bei 18,5 min zusätzlich zu dem Chanoclavin-I (1) und dem Chanoclavin-I-Aldehyd (2) Peak in den HPLC-Chromatogrammen detektiert wurde (Abbildung 4-11A und 4-11C). Mit zuvor Hitze-inaktiviertem FgaOx3-His₆ ist der Produktpeak nicht vorhanden (Abbildung 4-11B und 4-11D). Es konnte mehr Produkt erhalten werden, wenn Chanoclavin-I als Substrat verwendet und eine Koinkubation der beiden Enzyme FgaDH und FgaOx3 mit NAD⁺, FMN und NADPH statt einer Tandeminkubation durchgeführt wurde. Bei der Tandeminkubation wurde das Protein FgaDH vor der weiteren Inkubationen durch die Extraktion mit Ethylacetat entfernt, so dass nur das bereits gebildete Chanoclavin-I-Aldehyd durch FgaOx3 weiter umgesetzt werden konnte. Bei der Koinkubation konnte Chanoclavin-I dagegen immer weiter zu Chanoclavin-I-Aldehyd umgesetzt werden, da die Fläche des Chanoclavin-I Peaks im Vergleich zur Tandemreaktion stark reduziert ist. Weiterhin war es möglich, FMN durch FAD und/oder NADPH

durch NADH zu ersetzen. Der höchste Umsatz konnte allerdings mit der Kombination FMN/NADH erreicht werden.

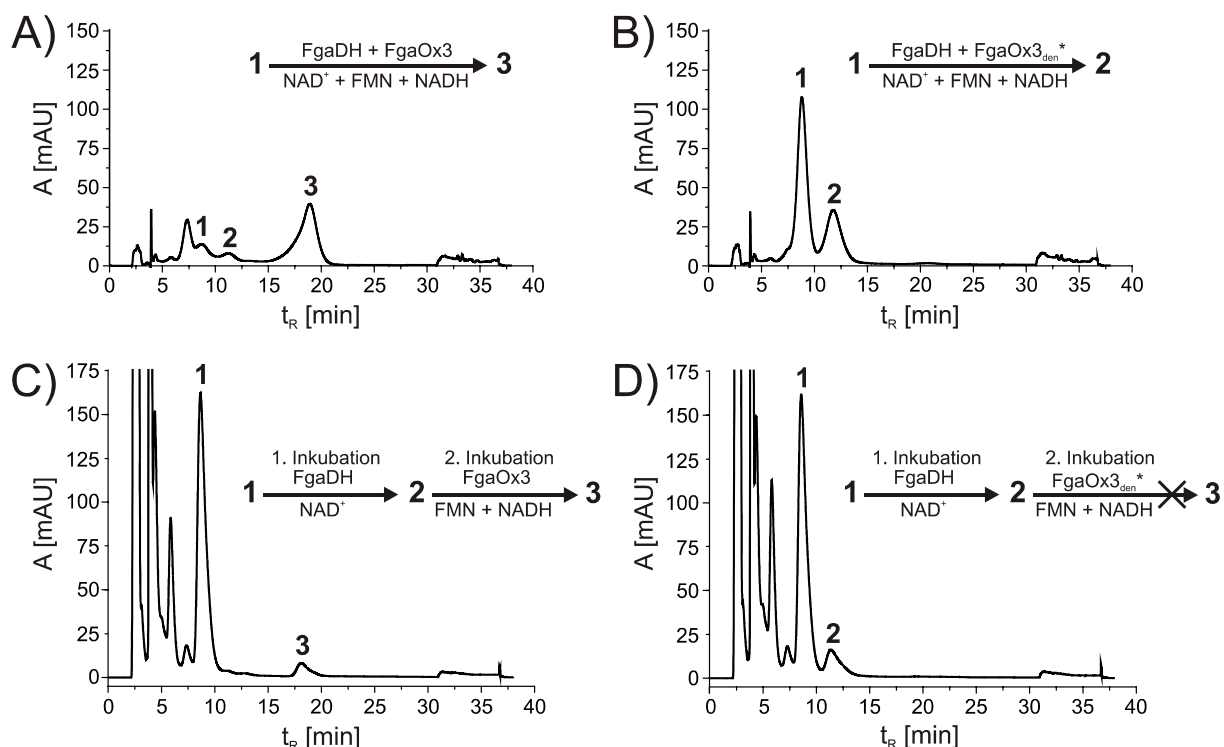


Abbildung 4-11: HPLC-Chromatogramme der Inkubationsgemische mit FgaOx3-His₆ A) als Koinkubation mit FgaDH-His₆ in Anwesenheit von NAD⁺, FMN und NADH, B) als Koinkubation mit Hitze-inaktiviertem FgaDH-His₆ in Anwesenheit von NAD⁺, FMN und NADH, C) als Tandeminkubation mit aktivem FgaOx3-His₆ und D) Tandeminkubation mit Hitze-inaktiviertem FgaOx3-His₆. Die Reaktionsansätze enthielten 5 mM des jeweiligen Kofaktors und 5 µg des jeweiligen rekombinanten Proteins. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für 16 h. Die Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 282 nm aufgenommen. (1: Chanoclavin-I, 2: Chanoclavin-I-Aldehyd, 3: Gemisch aus 3a und 3b, _{den}*: das Protein wurde für 30 min bei 100 °C denaturiert)

4.1.2.4 Strukturaufklärung des enzymatischen Produkts mit FgaOx3-His₆

Für die Isolierung und anschließende Strukturaufklärung des enzymatischen Produkts wurde ein 20 ml Reaktionsansatz mit 1 mM Chanoclavin-I, 1,5 mg FgaDH-His₆, 5 mM NAD⁺, 1,5 mg FgaOx3-His₆, 5 mM FMN und 5 mM NADH bei 30 °C für 16 Stunden inkubiert. Es konnte ein Umsatz von etwa 60 % erreicht werden (Abbildung 4-12). Nach der Isolierung mittels HPLC wurden etwa 3 mg Produkt für die NMR-Analyse erhalten und in CDCl₃ gelöst. Im Anhang befinden sich das MS-Spektrum und die gemessenen NMR-Spektren (¹H-NMR, ¹³C-NMR, E. COSY, HSQC, HMBC und NOESY) (Abbildung 7-5 bis Abbildung 7-20).

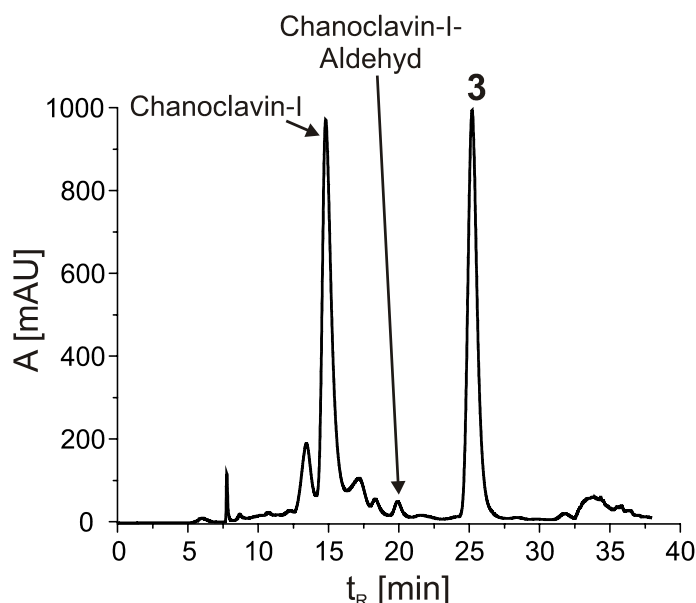


Abbildung 4-12: HPLC-Chromatogramm zur Isolierung des neuen Produktpeaks (3).

Das positive HR-ESI-MS-Spektrum des isolierten Produkts zeigte einen Peak mit hoher Intensität bei $m/z = 293,1262$ und einen Peak mit schwächerer Intensität bei $m/z = 271,1445$, die als die $[M+Na]^+$ und $[M+H]^+$ Ionen einer Substanz mit einem molekularen Gewicht von $270,1374 \text{ g/mol}$ und einer molekularen Formel von $C_{16}H_{18}N_2O_2$ zugeordnet werden konnten. Bestätigt wurde das molekulare Gewicht durch einen Peak bei $269,1302$ ($[M-H]^-$) im negativen HR-ESI-MS-Spektrum. Das bedeutet, dass die isolierte Substanz im Vergleich zum Chanoclain-I-Aldehyd mit einem molekularen Gewicht von 254 g/mol ein Sauerstoff-Atom mehr enthält. Um zu überprüfen, ob das bei der Reaktion eingefügte Sauerstoff-Atom als Hydroxygruppe vorliegt, wurde durch Dr. Steinbach ein Deuterium Austausch Experiment durchgeführt. Nach der Behandlung der Substanz mit deuteriertem Methanol zeigte das positive HR-ESI-MS-Spektrum einen Peak bei $m/z = 294,1322$, entsprechend dem $[M+Na]^+$ Ion einer Substanz mit der molekularen Formel $C_{16}H_{17}D_1N_2O_2$. Dies zeigt, dass bei der isolierten Substanz nur ein Proton austauschbar war und somit nur eine Hydroxy- oder Aminogruppe vorliegen kann.

Nachdem die molekulare Formel der Struktur bekannt war, erfolgte mit Hilfe der NMR Spektren die Strukturaufklärung. Die chemischen Verschiebungen des 1H - und ^{13}C -Spektrums beziehen sich auf das Lösungsmittel Signal von $CDCl_3$ ($7,24$ und $77,0 \text{ ppm}$). Das 1H - und das ^{13}C -NMR-Spektrum sprachen dafür, dass der isolierte Peak ein Gemisch aus zwei sehr ähnlichen Substanzen mit derselben Anzahl an Protonen und Kohlenstoffatomen ist. Aus den Intensitäten im 1H -NMR-Spektrum konnte berechnet werden, dass die beiden Substanzen in einem Verhältnis von **7 (3a)** zu **3 (3b)** vorliegen. Die Tabelle 4-4 listet die chemischen Verschiebungen, die

Multiplizitäten und die Kopplungskonstanten der ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Signale von **3a** und **3b** auf. Die Zuordnung der Signale basiert auf dem ^1H -, ^{13}C -, DQF-COSY-, HSQC-, HMBC- und dem NOESY-Spektrum. Die Nummerierung der Atome befindet sich in Abbildung 4-13.

Tabelle 4-4: ^1H - (600 MHz) und ^{13}C -NMR- (100 MHz) Daten von **3a** und **3b** in CDCl_3 bei 300 K.

Position	3a		3b		HMBC-Korrelationen
	δ_{H} [ppm] Multiplizität (J [Hz])	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm] Multiplizität (J [Hz])	δ_{C} [ppm]	
1	8,06 s	-	8,01 s	-	C-3, 16
2	6,91 s	118,0	6,88 s	117,9	C-3, 15, 16
3	-	110,4	-	110,8	
4	3,02 dd (4,5; 14,9) 3,26 dd (9,6; 14,9)	26,9	2,96 dd (14,9; 4,9) 3,15 dd (15,2; 10,1)	24,7	C-2, 3, 5, 10
5	3,95 dt (4,4; 9,8)	59,5	4,75 dt (4,8; 10,0)	52,8	C-7, 10, 11, 18
6	-	-	-	-	
7	8,15 s	163,4	8,14 s	163,6	C-5, 18
8	-	206,7	-	207,6	
9	2,91 dd (6,2; 18,4) 2,84 dd (4,3; 18,0)	44,3	2,98 dd (6,7; 18,2) 2,78 dd (18,0; 4,8)	45,7	C-5, 8, 10, 11
10	3,92 m*	35,8	3,95 m*	34,6	C-11, 12
11	-	131,8	-	132,5	
12	6,68 d (7,4)	114,8	6,69 d (8,0)	115,0	C-10, 14, 16
13	7,13 t (7,4)	123,4	7,12 t (7,0)	123,2	C-11, 15
14	7,20 d (8,1)	109,1	7,19 d (8,7)	108,8	C-12, 16
15	-	133,7	-	133,7	
16	-	125,8	-	126,0	
17	2,28 s	30,7	2,28 s	30,6	C-8, 9
18	2,86 s	26,4	2,84 s	30,8	C-5, 7

(*: Signale überlappen im Spektrum)

Es zeigte sich, dass die chemischen Verschiebungen der Protonen an C-4 und am Indolring von **3a** und **3b** einen Unterschied von weniger als 0,1 ppm zu denen von Chanoclavin-I-Aldehyd aufweisen, während die anderen Protonen von **3a** und **3b** in ihren chemischen Verschiebungen um mehr als 0,3 ppm von denen von Chanoclavin-I-Aldehyd abweichen (Tabelle 4-1). Dass das drei Ringsystem A/B/C aus Chanoclavin-I-Aldehyd in den Strukturen **3a** und **3b** erhalten geblieben ist, zeigt das HMBC-Spektrum und die Korrelationen im COSY zwischen H-5 von **3a** und **3b** mit H-4 und H-10 von **3a** und **3b**. Das olefinische Proton H-9 des Aldehyds bei 6,47 ppm ist dagegen im ^1H -Spektrum von **3a** und **3b** nicht mehr vorhanden. Stattdessen liegen an C-9 jetzt zwei miteinander koppelnde Protonen bei 2,91 und

2,84 ppm für **3a** und bei 2,98 und 2,78 ppm für **3b** vor. Diese Protonen koppeln mit H-10 bei 3,92 ppm in dem COSY Spektrum von **3a** und bei 3,95 ppm in dem von **3b**. Das bedeutet, dass die Doppelbindung zwischen C-8 und C-9 aus Chanoclatin-I-Aldehyd reduziert wurde. Weiterhin zeigt sich, dass in **3a** und **3b** C-8 als Carbonylgruppe vorliegt und die Formylgruppe an C-8 entfernt wurde. C-8 besitzt jetzt eine für Carbonylgruppen typische chemische Verschiebung von 206,7 ppm bzw. 207,6 ppm und im HSQC Spektrum zeigt sich, dass sich an C-8 kein Proton befindet. Außerdem korreliert im HMBC-Spektrum C-8 mit H-9 und H₃-17 bei 2,28 ppm (Abbildung 4-13). Das Signal für das Aldehydproton (H-7) des Chanoclatin-I-Aldehyds ist hochfeldverschoben von 9,47 ppm zu 8,15 (**3a**) bzw. 8,14 ppm (**3b**). C-7 von **3a** und **3b** korreliert mit H-5 bei 3,95/4,75 und H₃-18 bei 2,86/2,84 ppm im HMBC-Spektrum. Zusätzlich korreliert umgekehrt H-7 mit C-5 und C-7. Es konnten jedoch keine Korrelationen von H-7 mit C-8 und C-9 oder von H-9 mit C-7 in den HMBC-Spektren von **3a** und **3b** beobachtet werden. Das bedeutet, dass C-7 jetzt an N-6 gebunden vorliegt, wie bei dem tetrazyklischen Ergolinringsystem üblich, der vierte Ring aber nicht geschlossen vorliegt, da zwischen C-7 und C-9 keine Bindung existiert.

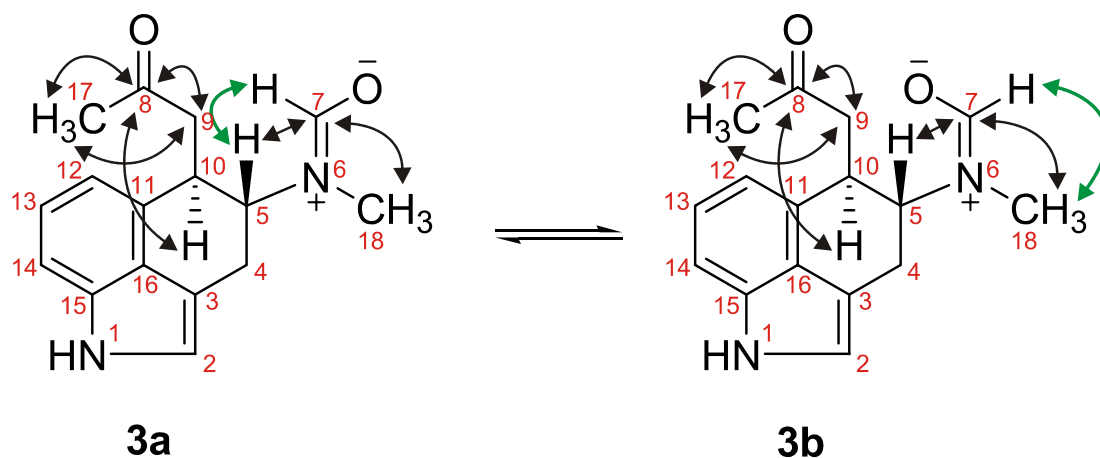


Abbildung 4-13: HMBC- (schwarze Pfeile) und NOE-Korrelationen (grüne Pfeile) von 3a und 3b. Dargestellt sind nur die Korrelationen, die für die Strukturaufklärung wichtig sind.

Die NMR-Daten lassen sich nur mit der Struktur von *N*-Methyl-*N*-[(5*R*,10*R*)-10-(2-oxo-propyl)-2,4,5,10-tetrahydrobenzo[cd]indol-5-yl]formamid übereinbringen. Der Vergleich der ¹H-NMR-Spektren von **3a** und **3b** untereinander zeigte weiterhin, dass sich die Signale der beiden Substanzen mit Ausnahme des Signals für H-5 in der chemischen Verschiebung um weniger als 0,1 ppm unterscheiden. Die chemische Verschiebung von H-5 ist bei **3a** im Vergleich zu **3b** von 4,75 auf 3,95 ppm hochfeldverschoben. Der Vergleich der ¹³C-NMR-Spektren zeigte, dass sich ebenfalls nur die chemischen Verschiebungen von C-5 und C-18 von **3a** und **3b**

stärker unterscheiden, während die chemischen Verschiebungen der anderen C-Atome um weniger als 2,2 ppm voneinander abweichen.

Das spricht dafür, dass sich die beiden Substanzen **3a** und **3b** nur in der Konfiguration der partiellen Doppelbindung zwischen N-6 und C-7 unterscheiden. Das Gemisch setzt sich demnach aus den *E/Z*-Isomeren zusammen (Abbildung 4-13). Bestätigt wird die *E/Z*-Isomerie durch die NOE-Kontakte (Abbildung 4-13). Starke NOE-Kontakte konnten für **3a** zwischen H-5 und H-7 und für **3b** zwischen H-5 und H-18 nachgewiesen werden. FgaOx3 katalysiert also formell die Migration der Formylgruppe des Chanoclavin-I-Aldehyds von C-8 zu N-6 von **3a** und **3b** und den Einbau eines Sauerstoff-Atoms an C-8.

E/Z-Isomerie in tertiären Amiden wurde bereits beschrieben und kommt auch in der Proteinanalytik bei Beteiligung von Aminosäuren mit sekundären α -Aminogruppen (Prolin) vor (Friebolin 1999; Holtzhauser & Behlke 1996). Aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters (Abbildung 4-14) ist die Rotation um die C-N Bindung bei Raumtemperatur langsam und die Signale für beide Isomere erscheinen im NMR-Spektrum. Die schrittweise Erhöhung der Temperatur von 300 K auf 393 K führte dazu, dass durch schnellere Rotationsgeschwindigkeit die Signale der Protonen von **3a** und **3b** miteinander verschmolzen und in dem ^1H -NMR-Spektrum (DMSO- D_6) bei 393 K nur noch Signale für eine Struktur vorlagen. Sobald die Probe wieder auf 300 K abgekühlt war, erschienen erneut die Signale für die zwei Isomere. Dieser Versuch zeigte, dass die beiden Isomere im Gleichgewicht zueinander liegen und ein reversibler dynamischer Austauschprozess stattfindet. Für asymmetrisch substituierte Formamide wurde berichtet, dass das stabilere *E* Isomer, bei dem der größere Substituent in *trans* zu dem Carbonylsauerstoff steht, ungefähr 70 % des Gemischs ausmacht (Pretsch *et al.*, 2000). Dies konnte auch bei **3a** und **3b** beobachtet werden.

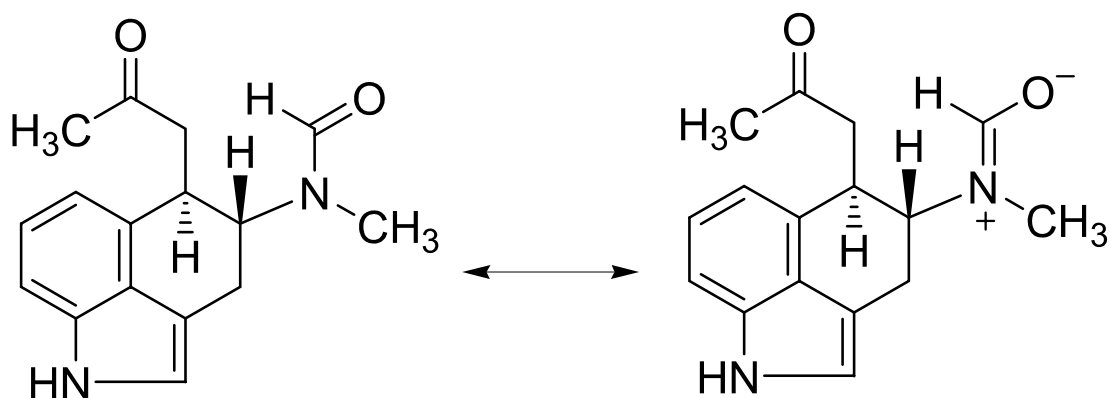


Abbildung 4-14: Die Resonanzstrukturen von 3.

4.1.3 Charakterisierung der Festuclavin-Synthase FgaFS aus *Aspergillus fumigatus*

4.1.3.1 Optimierung der Expressionsbedingungen von *fgaFS*

Das Expressionskonstrukt pMM003, das von Marco Matuschek übernommen wurde, enthält das Gen *fgaFS* (früher als *fgaOrfA* bezeichnet) im Expressionsvektor pQE-70. Das abgeleitete Genprodukt FgaFS weist eine Sequenzidentität von 46 % mit EasG aus *C. purpurea* (AAW57089.1) (Schardl *et al.*, 2006) bzw. 48 % mit EasG aus *C. fusiformis* (ABV57825.1) auf. Es konnte keine Homologie zu bekannten Proteinen gefunden werden. Die Expression in Zellen von *E. coli* XL1-Blue MRF' konnte bereits erfolgreich von Marco Matuschek durchgeführt werden. Die Ausbeute aus einem Liter Kultur war 0,4 mg FgaFS-His₆.

Zu einem späteren Zeitpunkt standen M15 *E. coli* Zellen zur Verfügung, ein Expressionsstamm, der speziell für pQE Vektoren eine höhere Proteinausbeute ermöglichen soll. Daher wurden M15 Zellen mittels Hitzeschock-Transformation mit dem Plasmid pMM003 transformiert. Die Expression erfolgte in 1 Liter LB- bzw. TB-Medium mit 0,5 mM IPTG für 21 h bei 22 °C. Die Protein-Ausbeute lag mit den neuen M15 Zellen bei 1,5 mg (LB) bzw. 0,9 mg (TB) (Abbildung 4-15).

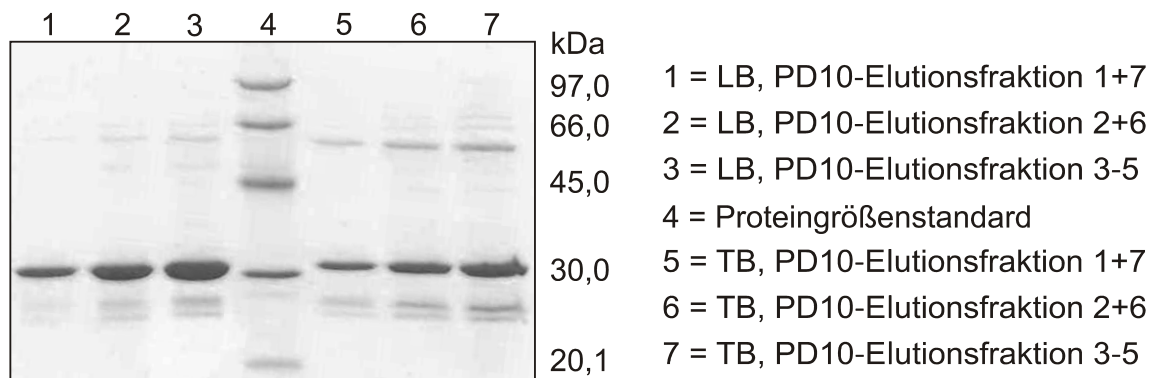


Abbildung 4-15: SDS-PAGE der Aufreinigung von FgaFS-His₆. Es wurde ein 15 % Trenngel verwendet.

4.1.3.2 Aktivitätstests mit FgaFS-His₆

Es wurde getestet, ob FgaFS für die weitere Umsetzung des Produktgemischs aus **3a** und **3b** (Abbildung 4-16B) verantwortlich ist. Da nicht bekannt war, welche Kofaktoren für dieses Enzym benötigt werden, wurden die Kofaktoren von

FgaOx3, NADH und FMN, verwendet. Die Inkubation von Chanoclavin-I mit FgaDH, FgaOx3 und FgaFS in Gegenwart von NAD⁺, NADH und FMN resultierte in der Bildung eines neuen Produktpeaks (**4**) mit einer Retentionszeit von 20,5 min (Abbildung 4-16C). Dieser Peak war in dem Reaktionsansatz dominant, während der Peak des Gemischs aus **3a** und **3b** bei 18,9 min kaum vorhanden war. Der Peak bei 20,5 min konnte in dem Reaktionsansatz mit hitze-inaktiviertem FgaFS nicht detektiert werden (Abbildung 4-16D). Weiterhin konnte die Bildung dieses Peaks weder bei der Inkubation von Chanoclavin-I mit FgaOx3 (Abbildung 4-16E) oder FgaFS allein (Abbildung 4-16F), noch bei den Inkubationen mit den Enzymkombinationen FgaDH und FgaFS (Abbildung 4-16G) bzw. FgaOx3 und FgaFS (Abbildung 4-16H) beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Chanoclavin-I-Aldehyd und nicht Chanoclavin-I als Substrat dient und dass Chanoclavin-I-Aldehyd durch FgaOx3 zu dem Gemisch aus **3a** und **3b** umgesetzt wird. Ist zusätzlich zu FgaOx3 das Enzym FgaFS im Reaktionsansatz vorhanden, entsteht aus Chanoclavin-I-Aldehyd ein anderes enzymatisches Produkt.

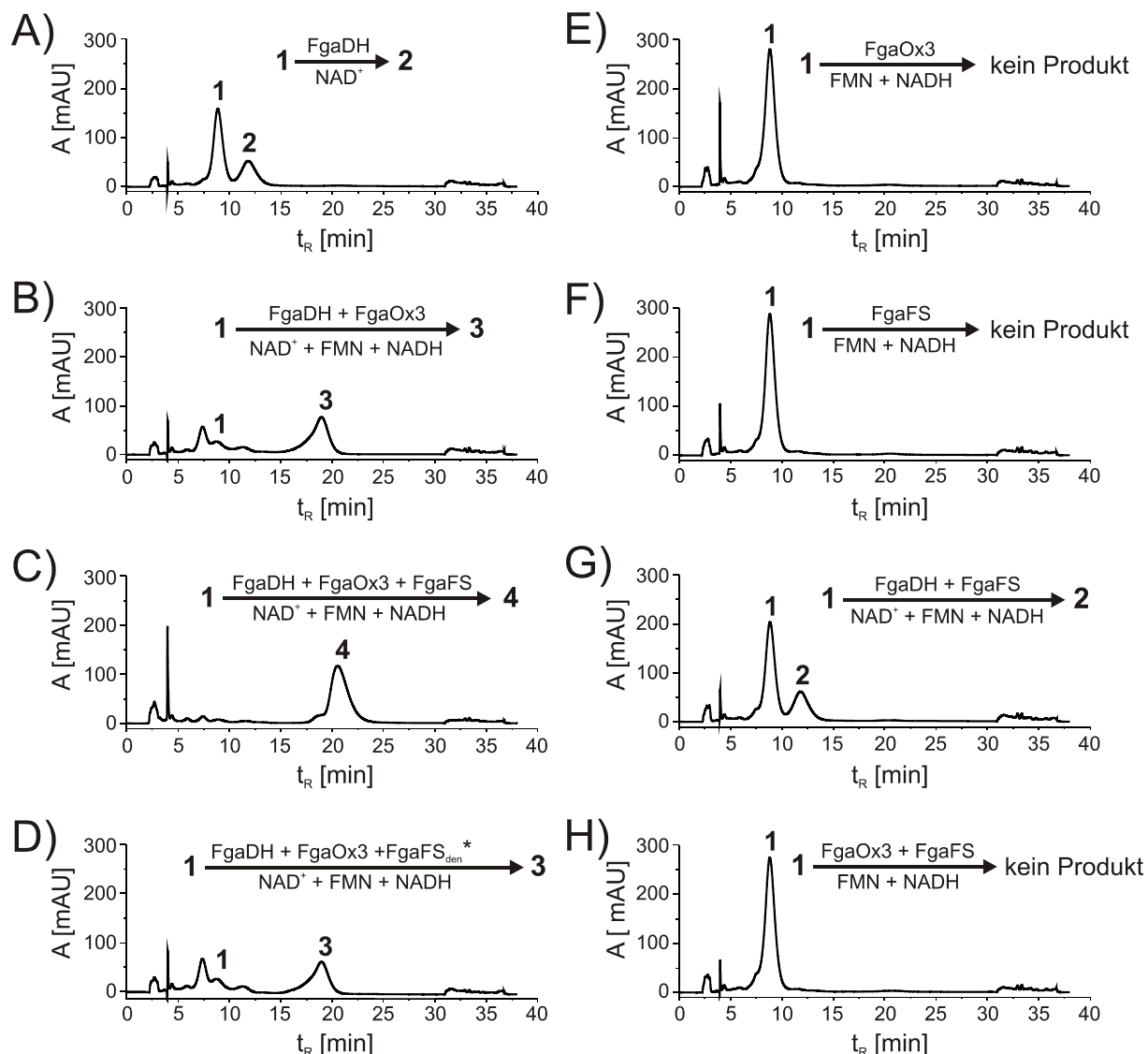


Abbildung 4-16: Die HPLC-Chromatogramme der Inkubationsgemische mit verschiedenen Enzymkombinationen. Die Reaktionsansätze enthielten 1 mM Chanoclavlin-I, 5 mM NAD^+ und /oder FMN und NADH und je 5 μg der jeweiligen Enzyme. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für 16 h. Die Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 282 nm aufgenommen. (1: Chanoclavlin-I, 2: Chanoclavlin-I-Aldehyd, 3: Gemisch aus 3a und 3b, 4: Festuclavin, _{den}*: das Protein wurde für 30 min bei 100 °C denaturiert)

4.1.3.3 Strukturaufklärung des enzymatischen Produkts mit FgaOx3-His₆ und FgaFS-His₆

Zur Strukturaufklärung wurde ein 20 ml Reaktionsansatz mit 1 mM Chanoclavlin-I, 1,5 mg FgaDH-His₆, 1,5 mg FgaOx3-His₆ und 1,5 mg FgaFS-His₆ bei 30 °C für 16 h inkubiert. Es konnte ein fast vollständiger Umsatz zu dem Produkt detektiert werden (Abbildung 4-17A). Die Substanz, die die Schulter auf der linken Seite verursachte, konnte trotz Methodenoptimierungsversuchen mit der semipräparativen Säule nicht

einzelnen aufgelöst werden, so dass keine getrennte Isolierung der Substanzen möglich war. Der Anteil dieser Substanz in dem Gemisch war mit etwa 5 % jedoch so gering, dass sowohl bei den NMR-Spektren als auch bei der Massenspektrometrie Signale dieser Substanz nicht detektiert werden konnten. Aufgrund der Retentionszeit dieser Substanz, die auch bei den Reaktionen im 100 μ l Maßstab in den HPLC-Chromatogrammen zu sehen ist, könnte es sich um kleine Mengen des Reaktionsgemischs aus **3a** und **3b** handeln. Nach einer Erneuerung der Vorsäule verbesserte sich die Trennleistung und es zeigte sich, dass es sich bei dieser Schulter um mindestens zwei Substanzen handelte (Abbildung 4-17B). Die Schulter wurde isoliert, aber die Menge war zu gering, um die Strukturen aufzuklären. Später konnten Matuschek *et al.* durch Zuhilfenahme einer anderen Enzymkombination (FgaOx3 mit EasG aus *C. purpurea*) zeigen, dass es sich um ein Gemisch aus **3a**, **3b** und Pyroclavin handelt, mit Pyroclavin als Hauptkomponente (Matuschek *et al.*, 2012).

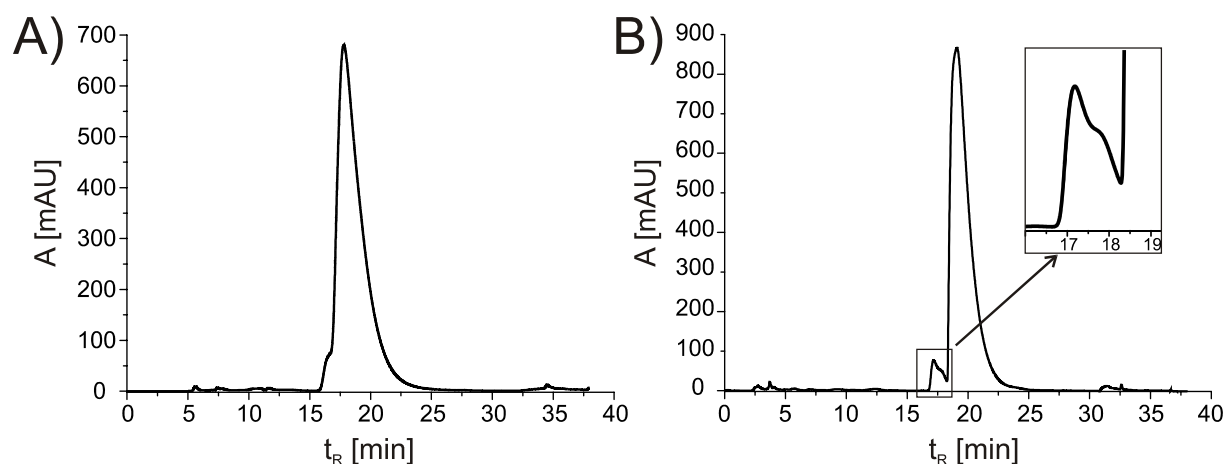


Abbildung 4-17: HPLC-Chromatogramme zur Isolierung von 4. A) vor dem Vorsäulenwechsel B) nach dem Vorsäulenwechsel.

Nach der Isolierung mittels HPLC wurden etwa 4 mg Produkt für die MS- und NMR-Analyse erhalten und mittels Ammoniumhydroxid deprotoniert. Da die Probe in CDCl_3 eine schlechte Löslichkeit besaß, wurde als Lösungsmittel CD_3OD verwendet. Im Anhang befinden sich die gemessenen Spektren (^1H -NMR, DQF-COSY, HSQC, HMBC und NOESY). Die Tabelle 4-5 listet die chemischen Verschiebungen, die Multiplizität und die Kopplungskonstanten im ^1H -NMR- sowie die chemischen Verschiebungen im ^{13}C -NMR- und die Korrelationen im HMBC-Spektrum der isolierten Substanz auf. Die chemischen Verschiebungen des ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrums beziehen sich auf das Lösungsmittelsignal von CD_3OD (3,30 und 49,0 ppm). Die Zuordnung der Signale basiert auf dem ^1H -, ^{13}C -, DQF-COSY-, HSQC-,



Die isolierte Substanz ließ sich daher eindeutig als Festuclavin mit der chemischen Formel $C_{16}H_{20}N_2$ identifizieren. Bestätigt wurde dies auch durch das ESI-Spektrum (Abbildung 7-33 im Anhang) und die HR-ESI-MS-Daten mit dem $[M+1]^+$ Ion bei $m/z = 241,1673$ (berechneter Wert 241,1705).

Tabelle 4-5: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von Festuclavin in CD_3OD .

Position	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	Multiplizität (J [Hz])	HMBC-Korrelationen
2	120,15	7,02 d (1,4)		C-2 mit H-4 $_{\alpha}$
3	108,22	-		C-3 mit H-2, 4 $_{\alpha}$
4 $_{\alpha}$	25,62	2,98 ddd (13,9; 11,7; 1,6)		C-4 mit H-2, 18
4 $_{\beta}$		3,64 dd (12,7; 5,0)		-
5 $_{\beta}$	68,35	3,20 dt (4,1; 11,3)		C-5 mit H-4 $_{\alpha}$, 7 $_{\alpha}$, 7 $_{\beta}$, 9 $_{\beta}$, 10 $_{\alpha}$, 18
7 $_{\alpha}$	63,13	3,55 ddd (12,1; 3,8; 1,7)		C-7 mit H-9 $_{\beta}$, 17, 18
7 $_{\beta}$		2,86 t (12,4)		-
8 $_{\alpha}$	30,01	2,25 m		C-8 mit H-9 $_{\beta}$, 17
9 $_{\alpha}$	35,55	2,79 ddt (13,3; 1,9; 3,6)		C-9 mit H-7 $_{\alpha}$, 7 $_{\beta}$, 10 $_{\alpha}$, 17
9 $_{\beta}$		1,33 dt (12,2; 12,7)		-
10 $_{\alpha}$	40,13	3,29 dt (3,2; 11,4)		C-10 mit H-9 $_{\beta}$, 12
11	130,23	-		C-11 mit H-9 $_{\beta}$, 10 $_{\alpha}$, 13
12	113,77	6,90 d (7,6)		C-12 mit H-10 $_{\alpha}$, 14
13	123,63	7,11 t (7,7)		C-13 mit H-12
14	110,45	7,21 d (8,1)		C-14 mit H-12
15	134,99	-		C-15 mit H-2, 13
16	126,71	-		C-16 mit H-2, 12, 14
17	18,56	1,13 d (6,6)		C-17 mit H-7 $_{\beta}$, 8 $_{\alpha}$, 9 $_{\beta}$
18	41,31	3,06 s		-

Tabelle 4-6: NOE-Kontakte zur Überprüfung der Stereochemie.

Protonen	Stärke	Protonen	Stärke	Protonen	Stärke
H-5 $_{\beta}$ mit H-7 $_{\beta}$	Medium	H-8 $_{\alpha}$ mit H-10 $_{\alpha}$	Medium	H-17 mit H-7 $_{\beta}$	Medium
H-5 $_{\beta}$ mit H-9 $_{\beta}$	Medium	H-8 $_{\alpha}$ mit H-7 $_{\alpha}$	Medium	H-17 mit H-9 $_{\beta}$	Medium
		H-8 $_{\alpha}$ mit H-9 $_{\alpha}$	Medium		

Da sich das isolierte Festuclavin nicht in CDCl_3 löste, konnte kein Vergleich mit den NMR-Daten in der Literatur durchgeführt werden. Daher wurde ein ^1H -NMR-Spektrum einer von Prof. Leistner zur Verfügung gestellten Festuclavin-Probe in CD_3OD aufgenommen. Das zuvor aufgenommene ^1H -NMR-Spektrum dieser Substanz in CDCl_3 (Abbildung 7-34 im Anhang) und der Vergleich mit NMR-Daten aus der Literatur bestätigte, dass es sich bei der zur Verfügung gestellten Substanz um Festuclavin handelte (Bach *et al.*, 1974; Kawai *et al.*, 1992; Nakahara *et al.*, 1977; Sakharovsky & Kozlovsky 1983).

Das ^1H -NMR-Spektrum des Festuclavin-Standards in CD_3OD stimmte jedoch nicht mit dem der isolierten Substanz überein. Ein ^1H -NMR-Spektrum (CD_3OD) des enzymatischen Produkts nach erneuter Isolierung, diesmal ohne Deprotonierung,

zeigte, dass der Deprotonierungsversuch nach der ersten Isolierung nicht erfolgreich war und die Probe weiterhin in protonierter Form vorlag. Deshalb wurde der Festuclavin-Standard durch Behandlung mit TFA-haltigen HPLC-Lösungsmitteln protoniert und erneut ein ^1H -NMR-Spektrum in CD_3OD aufgenommen (Abbildung 7-35 im Anhang). Das ^1H -NMR-Spektrum des protonierten Festuclavin-Standards stimmte diesmal mit dem der isolierten Substanz überein. Das bedeutet, das FgaFS zusammen mit FgaOx3 in Anwesenheit von FMN und NADH die Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin katalysiert und somit als Festuclavin-Synthase fungiert.

4.1.3.4 Weiterführende Aktivitätstests mit verschiedenen Kombinationen von FgaDH-His₆, FgaOx3-His₆ und FgaFS-His₆

Die erste Reihe von Inkubationen (Kapitel 4.1.3.2) konnte bereits zeigen, dass die beiden Enzyme FgaOx3 und FgaFS zusammen in die Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin involviert sind. Um die Rolle der einzelnen Proteine genauer zu bestimmen, wurde eine weitere Inkubationsreihe durchgeführt (Abbildung 4-19). Dabei wurden mehrere Inkubationen hintereinander durchgeführt. Der eingeeengte Extrakt der vorherigen Inkubation wurde jeweils als Substrat für die nächste Inkubation verwendet. Da für die Auswertung dieser Versuchsreihe eine andere HPLC-Anlage verwendet wurde, zeigt sich für alle Substanzen eine einheitliche Verschiebung der Retentionszeiten.

Wie erwartet resultierte die Inkubation von Chanoclavin-I mit FgaDH in der Bildung von Chanoclavin-I-Aldehyd (Abbildung 4-19A). Die weitere Inkubation mit FgaOx3 führte zu der Bildung der Isomere **3a** und **3b** (Abbildung 4-19B), während die zweite Inkubation mit FgaOx3 und FgaFS zusammen zu Festuclavin führte (Abbildung 4-19C). Da das Protein FgaDH vor den weiteren Inkubationen durch die Extraktion mit Ethylacetat entfernt wurde, konnte nur das bereits gebildete Chanoclavin-I-Aldehyd weiter umgesetzt werden. Daher war die Umsetzung von Chanoclavin-I zu **3a/3b** bzw. Festuclavin sehr viel geringer als bei den Koinkubationen (Abbildung 4-19B und 4-19C) und Chanoclavin-I wurde in diesen Ansätzen als dominanter Peak detektiert. Bei der Koinkubation von FgaDH, FgaOx3 und FgaFS fand, wie schon zuvor gezeigt (Abbildung 4-15C), eine fast vollständige Umsetzung von Chanoclavin-I zu Festuclavin statt (Abbildung 4-19D).

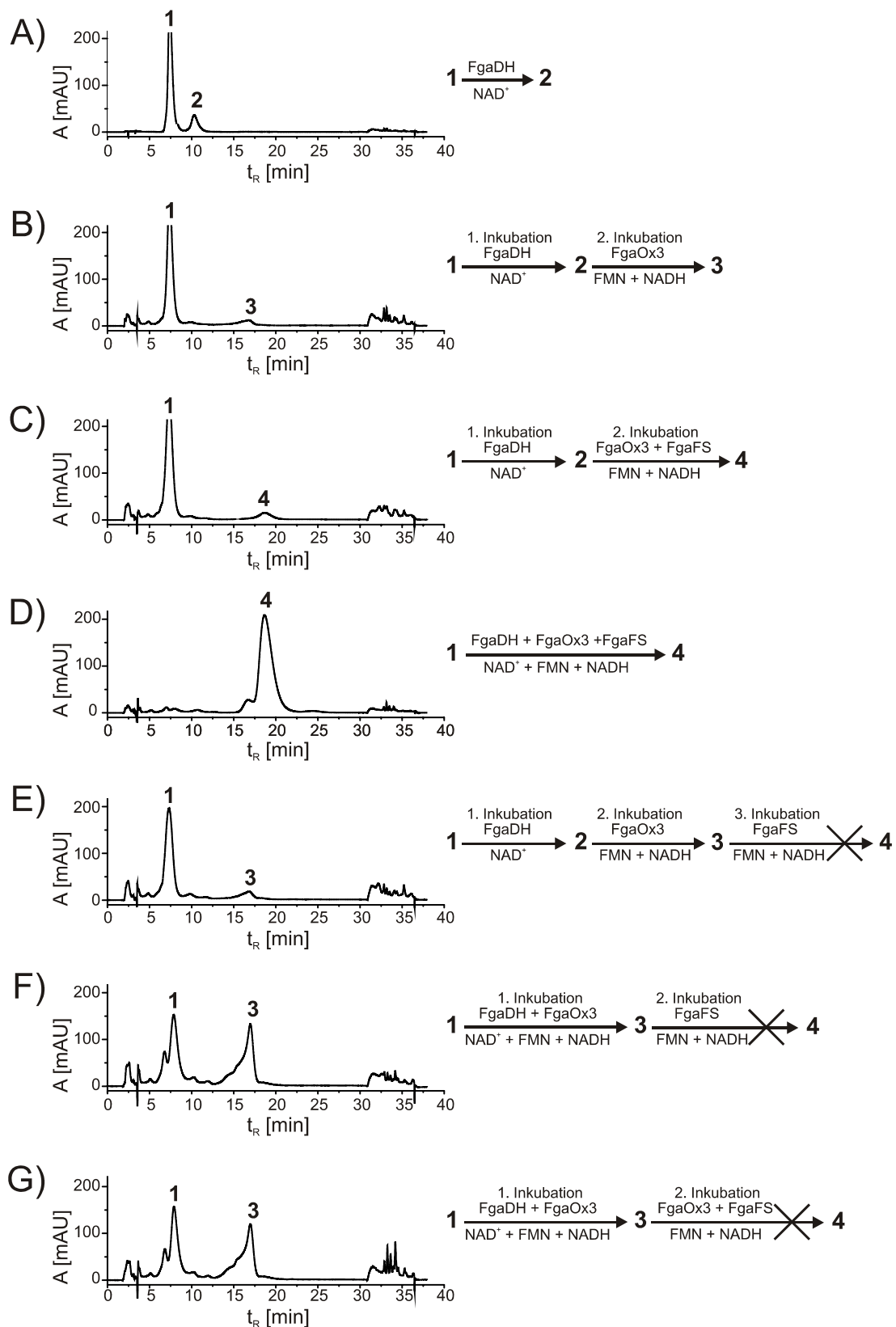


Abbildung 4-19: HPLC-Chromatogramme der Tandemreaktionen mit unterschiedlichen Enzym- und Kofaktor-Kombinationen. Die Reaktionsansätze enthielten 5 mM von jedem Kofaktor, 1 mM Chanoclavin-I und 5 µg des jeweiligen Enzymes. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für 16 h. Die Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 282 nm aufgenommen. (1: Chanoclavin-I, 2: Chanoclavin-I-Aldehyd, 3: Gemisch aus 3a und 3b, 4: Festuclavin)

Interessanterweise konnte das Gemisch aus **3a** und **3b**, das durch Ko- oder Tandeminkubation von Chanoclavin-I mit FgaDH und FgaOx3 erhalten wurde, in einer weiteren Inkubation weder mit FgaFS (Abbildung 4-19E und 4-19F) noch mit FgaOx3 und FgaFS zusammen zu Festuclavin umgesetzt werden (Abbildung 4-19G). Das beweist eindeutig, dass keins der beiden Isomere als Substrat für FgaFS dient oder durch eine weitere Zugabe von FgaOx3 weiter umgewandelt bzw. aktiviert wird, um dann anschließend von FgaFS zu Festuclavin umgesetzt zu werden.

4.1.3.5 Biochemische Eigenschaften von FgaFS-His₆ und Bestimmung der kinetischen Parameter

In Anwesenheit von 5 µg FgaDH-His₆ und 5 µg FgaOx3-His₆ mit Chanoclavin-I als Substrat, zeigt die von FgaFS katalysierte Reaktion im 100 µl Ansatz eine lineare Abhängigkeit von der Proteinmenge bis 0,5 µg und der Inkubationszeit bis 90 min (Abbildung 4-20). Da für das Enzym FgaOx3 bereits FMN und NADH als Kofaktoren nötig sind und die von FgaFS katalysierte Reaktion nur stattfindet, wenn FgaOx3 anwesend ist, kann nicht bestimmt werden, ob und welche Kofaktoren für FgaFS notwendig sind. Weiterhin kann kein K_M -Wert bestimmt werden, da zum Einen Chanoclavin-I-Aldehyd nur durch FgaOx3 zusammen mit FgaFS zu Festuclavin umgesetzt wird und zum Anderen bei Koinkubationen die Konzentration von Chanoclavin-I-Aldehyd schwierig zu bestimmen ist. Wie schon bei FgaOx3 beobachtet, kann NADH durch NADPH und FMN durch FAD ersetzt werden, wobei der höchste Umsatz jedoch wieder mit NADH und FMN erhalten wurde.

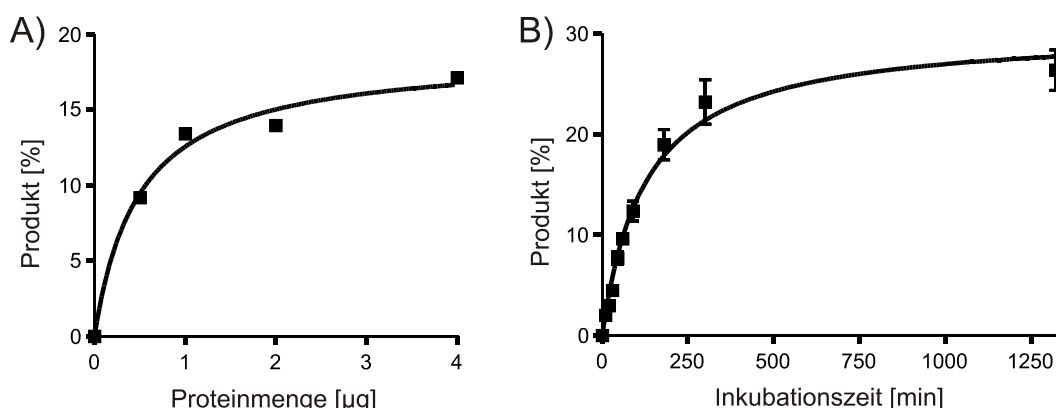


Abbildung 4-20: Abhängigkeit der Produktbildung der FgaFS-Reaktion von A) der Proteinmenge und B) der Inkubationszeit. Die Reaktionsansätze (100 µl) enthielten 1 mM Chanoclavin-I, 5 mM NAD⁺, 5 µg FgaDH-His₆, 5 mM FMN, 5 mM NADH, 5 µg FgaOx3-His₆ und A) unterschiedliche Mengen FgaFS-His₆ mit einer Inkubationszeit von 3 Stunden bzw. B) 1,5 µg FgaFS-His₆ mit variierenden Inkubationszeiten.

4.2 Versuche zur Prenylierung verschiedener Ergotalkaloide durch FgaPT1 aus *Aspergillus fumigatus*

4.2.1 Die Prenyltransferase FgaPT1

Das Prenyltransferasegen *fgaPT1* ist in dem Ergotalkaloidgencluster von *A. fumigatus* enthalten (Kapitel 1.5.2) und besitzt keine Homologen in den Genclustern der anderen Ergotalkaloidproduzenten. FgaPT1 katalysiert in *A. fumigatus* die Prenylierung von (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin A zu (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin C, dem Endprodukt des Ergotalkaloidbiosynthesewegs (Abbildung 4-21).

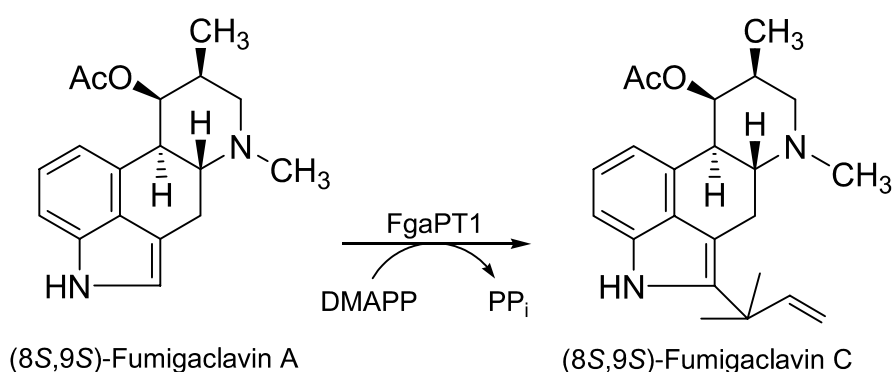


Abbildung 4-21: Die Prenylierung von (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin A zu (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin C durch FgaPT1.

In diesem Projekt sollte untersucht werden, ob die Prenyltransferase FgaPT1 ebenfalls für die Prenylierung von Festuclavin und (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin B verantwortlich sein kann. Grundlage für diese Fragestellung lieferten die zwei neuen Derivate von (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin C, 9-Deacetoxy-(8*S*)-Fumigaclavin C und 9-Deacetyl-(8*S*,9*S*)-Fumigaclavin C, die aus *A. fumigatus* isoliert wurden (Ge *et al.*, 2009). Strukturell entsprechen diese zwei Derivate C-2 prenyliertem Festuclavin bzw. (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin B. Da aufgrund der Sicherheitsbestimmungen nicht mit *A. fumigatus* gearbeitet werden durfte, wurden in dieser Arbeit die Fumigaclavine B und A aus *Penicillium commune* als Substrate verwendet. Diese besitzen eine (8*R*,9*S*)- statt einer (8*S*,9*S*)-Konfiguration.

Weiterhin sollte die Substratspezifität von FgaPT1 erneut untersucht werden, da mittlerweile Alkaloide vom Clavin-Typ (Festuclavin, Pyroclavin, Agroclavin) und einige Vorläufersubstanzen (4-DMA-L-Abrin, Chanoclavin-I-Aldehyd) enzymatisch hergestellt werden können.

Dieses Projekt sollte als Vorarbeit für weiterführende Versuche dienen. Die enzymatischen Produkte müssen u.a. isoliert und die Prenylierung mittels MS- und NMR-Analysen bestätigt werden. Da 9-Deacetoxy-(8S)-Fumigaclavin C und 9-Deacetyl-(8S,9S)-Fumigaclavin C zytotoxisch gegen humane Leukämiezellen wirken (Ge *et al.*, 2009), sollen die neuen Substanzen anschließend auf ihre biologische Aktivität hin untersucht werden. Das prenylierte Festuclavin (entspricht (8S)-9-Deacetoxyfumigaclavin C) kann als Positiv-Kontrolle für die Zytotoxizitätstests dienen. Das mit FgaPT1 aus Pyroclavin hergestellte 9-Deacetoxyfumigaclavin C unterscheidet sich in der Stereochemie an C-8 von denen bei Ge *et al.* (Abbildung 4-22). Das 9-Deacetylfumigaclavin C und Fumigaclavin C unterscheidet sich ebenfalls in der Stereochemie an C-8, da die Substrate aus *P. commune* stammen.

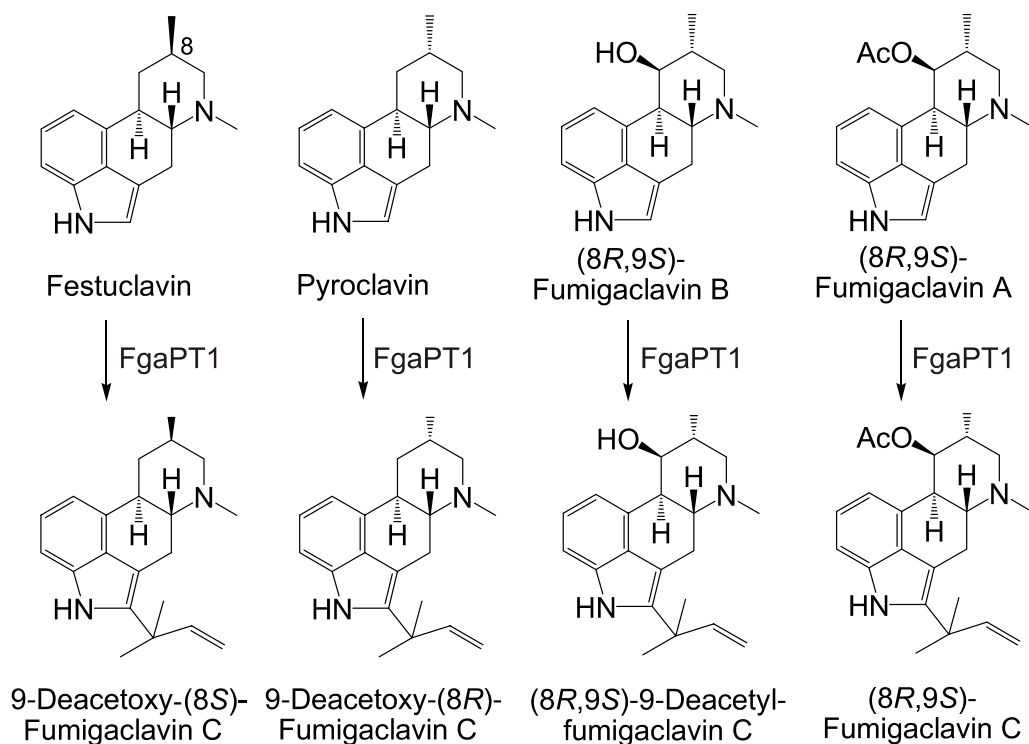
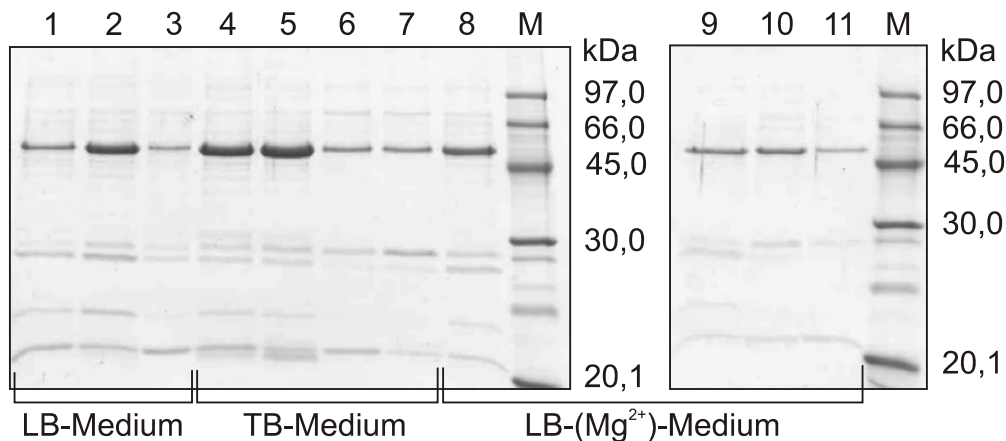


Abbildung 4-22: Strukturen hypothetischer Produkte der FgaPT1-Reaktion.

4.2.2 Optimierung der Expressionsbedingungen von *fgaPT1*

Das Expressionskonstrukt pIU9 (Unsöld & Li 2006) wurde mittels Hitzeschock-Transformation in *E. coli* BL21 Zellen eingebracht. Das Plasmid pIU9 enthält die codierende Sequenz von *fgaPT1* aus *A. fumigatus* in dem Expressionsvektor pRSET-B. Nach der erfolgreichen Transformation der Zellen wurden verschiedene Expressionsbedingungen im 100 ml Maßstab für das Gen *fgaPT1* getestet (Abbildung 4-23). Als Medium wurde LB-, TB- bzw. wie bei Unsöld & Li angegeben

LB-Medium mit MgCl_2 - und MgSO_4 -Zugabe (= $\text{LB}(\text{Mg}^{2+})$) verwendet. Die Expression wurde entweder mit 0,5 mM oder 2 mM IPTG induziert und erfolgte für jeweils 16 h. Als Temperatur wurde sowohl 25 als auch 37 °C getestet. Die Zellpellets wurden in jeweils 1 ml Lysepuffer resuspendiert und die lösliche Proteinfraction später mit 25 μl Ni-NTA-Agarose versetzt.



- | | |
|----------------------------|-------------------------------------------------------|
| M = Proteingrößenstandard | 6 = TB, 25 °C, 2,0 mM IPTG |
| 1 = LB, 37 °C, 2,0 mM IPTG | 7 = TB, 25 °C, 0,5 mM IPTG |
| 2 = LB, 37 °C, 0,5 mM IPTG | 8 = $\text{LB}(\text{Mg}^{2+})$, 37 °C, 0,5 mM IPTG |
| 3 = LB, 25 °C, 0,5 mM IPTG | 9 = $\text{LB}(\text{Mg}^{2+})$, 37 °C, 2,0 mM IPTG |
| 4 = TB, 37 °C, 2,0 mM IPTG | 10 = $\text{LB}(\text{Mg}^{2+})$, 25 °C, 0,5 mM IPTG |
| 5 = TB, 37 °C, 0,5 mM IPTG | 11 = $\text{LB}(\text{Mg}^{2+})$, 25 °C, 2,0 mM IPTG |

Abbildung 4-23: SDS-PAGE der Optimierung der Expressionsbedingungen von FgaPT1. Es wurde ein 15 % Trenngel verwendet. Aufgetragen sind die PD10-Elutionsfraktionen 3-5 der verschiedenen Bedingungen.

Die veröffentlichten Kultivierungsbedingungen mit $\text{LB}(\text{Mg}^{2+})$, 25 °C und 2 mM IPTG lieferten von allen getesteten Bedingungen die geringste Proteinausbeute. Das meiste Protein wurde mit TB-Medium, bei 37 °C und 0,5 mM IPTG erhalten. Schwache Verunreinigungen lagen bei allen Bedingungen vor. Da FgaPT1 für die folgenden Reaktionsansätze in größeren Mengen benötigt wurde, erfolgte die Aufreinigung des Proteins unter den optimierten Bedingungen aus 1 Liter Zellkultur. Dazu wurde das Zellpellet in 12 ml Lysepuffer resuspendiert und die lösliche Proteinfraction später mit 200 μl Ni-NTA-Agarose versetzt. Die Proteinausbeute betrug etwa 4 mg pro 1 Liter Zellkultur (Abbildung 4-24).

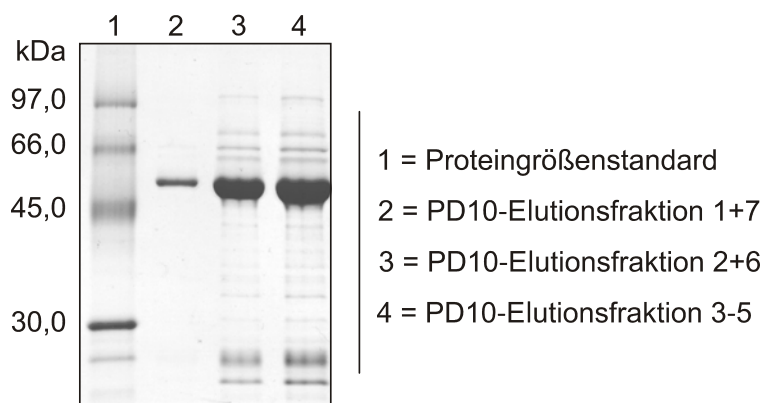


Abbildung 4-24: SDS-PAGE der Aufreinigung von His₆-FgaPT1 aus 1 Liter Zellkultur. Es wurde ein 15 % Trenngel verwendet.

4.2.3 Aktivitätstest mit His₆-FgaPT1 und neuen Substraten

Für den Test der Substratspezifität wurden verschiedene Alkaloide vom Clavin-Typ, die Vorläufermoleküle Chanoclain-I und Chanoclain-I-Aldehyd sowie das Ergoamid Ergometrin und das Ergopeptin Ergotamin als Substrat verwendet und mit FgaPT1, DMAPP und MgCl₂ inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für 16 h und das Abstoppen mit 1 Vol. Methanol. Die HPLC-Chromatogramme der Reaktionsansätze mit nativen FgaPT1 sind in Abbildung 4-25 dargestellt. Alle Substrate bis auf Ergotamin und Ergometrin wurden von FgaPT1 zu einem Produkt umgesetzt, bei dem es sich sehr wahrscheinlich um das Substrat mit einem Prenylrest handelt. Die Produktbildung mit Chanoclain-I-Aldehyd als Substrat war sehr gering (Abbildung 4-25B). Interessanterweise fand mit Pyroclavin (Abbildung 4-25D) eine höhere Produktbildung statt als mit (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A (Abbildung 4-25G). Hierbei sollte jedoch beachtet werden, dass die Konfiguration des verwendeten Fumigaclavin A nicht der des natürlichen Substrats entspricht. Zu einem späteren Zeitpunkt konnte (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A dann aber zu beinahe 100 % umgesetzt werden (Kapitel 4.2.4). Der zusätzliche kleine Peak im HPLC-Chromatogramm bei Ergometrin (Abbildung 4-25H) und auch bei Ergotamin (Abbildung 4-25I) liegt ebenfalls in den HPLC-Chromatogrammen der Kontrollen mit Hitze-inaktiviertem FgaPT1 vor. Daher kann es sich bei diesen Peaks um keinen Produktpeak handeln.

Zur Vollständigkeit wurden daraufhin die Substanzen im Biosyntheseweg vor Chanoclain-I-Aldehyd, d.h. L-Tryptophan, 4-DMAT und 4-DMA-L-Abrin, ebenfalls als Substrate getestet. Es konnte, ebenso wie bei verschiedenen zyklischen Tryptophan-haltigen Dipeptiden (L-Trp-L-Gly, L-Trp-L-Ala, L-Trp-D-Ala, D-Trp-D-Ala, L-Trp-L-Leu, L-Trp-L-Phe, L-Trp-L-Pro, D-Trp-L-Pro, L-Trp-L-Trp, L-Trp-L-Tyr, D-Trp-L-Tyr) und Flavonoiden ((±)-Catechin, (-)-Epicatechin, Naringenin, Eriodictyol, Dihydroquercetin,

3,4-Dihydroxyflavon, Apigenin, Luteolin, Kämpferol, Fisetin, Morin, Quercetin), kein Produkt detektiert werden.

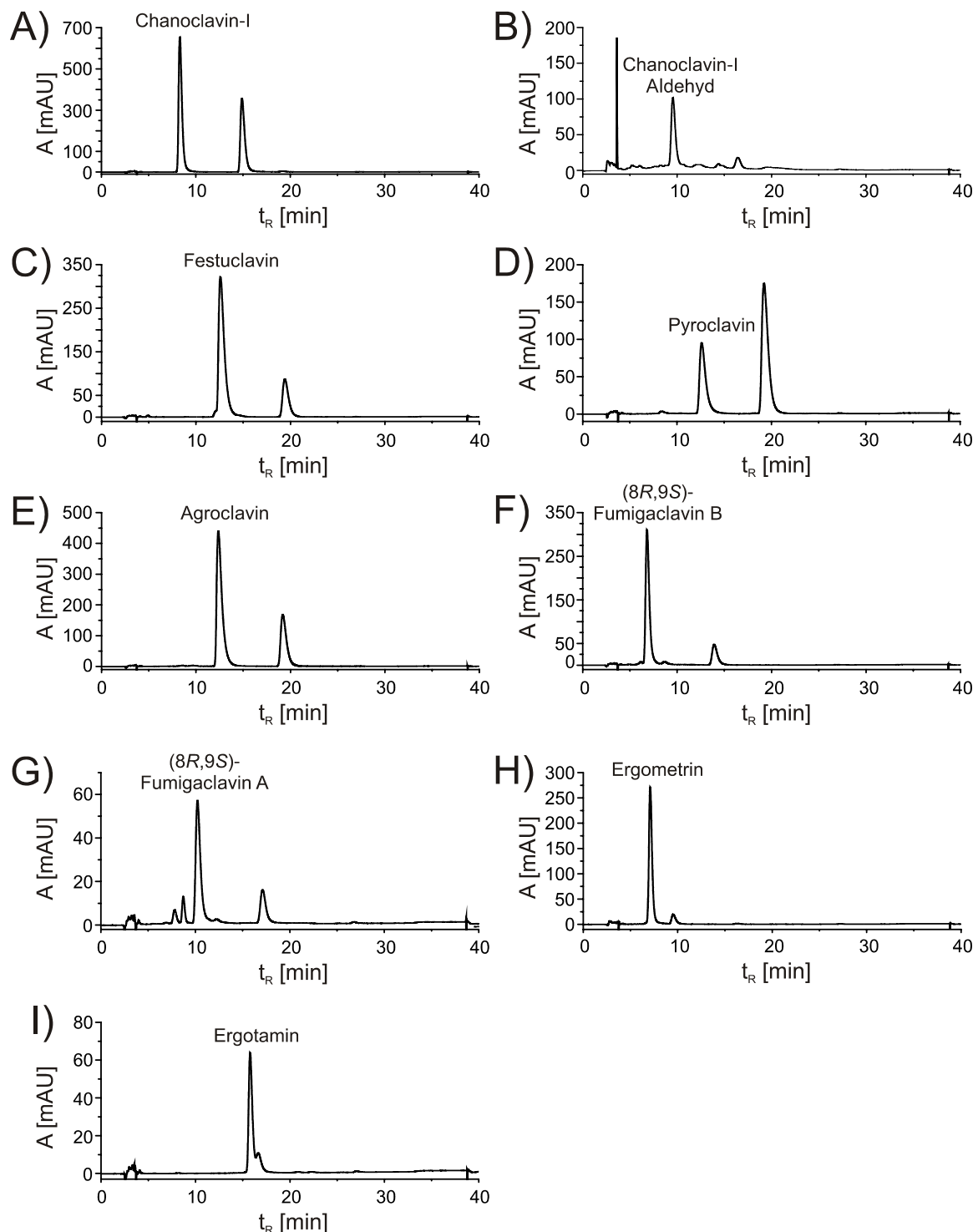


Abbildung 4-25: HPLC-Chromatogramme der Reaktionsansätze mit His₆-FgaPT1 und verschiedenen Ergotalkaloiden bzw. deren Vorläufermolekülen als Substrate. Die Reaktionsansätze enthielten 1 mM des jeweiligen Substrats, 5 µg His₆-FgaPT1, 2 mM DMAPP und 5 mM MgCl₂. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für 16 h. Die Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 282 nm aufgenommen.

Tabelle 4-7: Die ermittelten Umsätze in den Inkubationsgemischen.

Substrat	Umsatz
(8 <i>R</i> ,9 <i>S</i>)-Fumigaclavin A	23 %
(8 <i>R</i> ,9 <i>S</i>)-Fumigaclavin B	17 %
Festucaclavin	22 %
Pyroclavin	66 %
Agroclavin	29 %
Chanoclavin-I	41 %

4.2.4 Isolierung von (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A aus Extrakten von *Penicillium commune* NRRL 2033

Um in weiterführenden Arbeiten die Struktur des mit FgaPT1 umgesetzten (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A aufzuklären, musste das Substrat (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A in größeren Mengen isoliert werden. Dazu sind *P. commune* NRRL 2033 Extrakte von Beate Wollinsky zur Verfügung gestellt worden. Der Pilz produzierte unter einer ausgewählten Bedingung fast ausschließlich (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin. Die Isolierung erfolgte über eine Sephadex LH-20 Säule mit Methanol als Elutionsmittel. Die Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Als Standards dienten Chanoclavin-I, Festucaclavin, Pyroclavin, (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A und (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin B. Weiterhin wurde eine Probe des Gesamtextrakts vor der Isolierung aufgetragen.

Die Abbildung 4-26 zeigt die DC-Platten der Analyse der Fraktionen nach der Visualisierung mit van Urk-Reagenz. In den Fraktionen 20–26 waren unter UV-Licht Verunreinigungen zu erkennen. Daher wurden die Fraktionen 1-18, 19-26 sowie 27-37 vereint und noch einmal mittels HPLC analysiert (Abbildung 4-27). Als Standard dienten (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A und (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin B, das von Beate Wollinsky bzw. Xia Yu zur Verfügung gestellt worden war. Die Fraktionen 1-18 enthielten nur Verunreinigungen und die Fraktionen 10-26 sowohl Verunreinigungen als auch (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A, während die Fraktionen 27-37 fast ausschließlich (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A enthielt. Durch Vergleich der Peakfläche mit dem Standard von Beate Wollinsky wurde die Ausbeute an isoliertem (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A in den Fraktionen 27-37 auf etwa 5 mg geschätzt. Von dem (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A der Fraktionen 27-37 wurde ein ¹H-NMR in CDCl₃ gemessen (Abbildung 7-36 im Anhang). Der Vergleich mit Literaturdaten bestätigt, dass es sich um (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A handelt (Kawai *et al.*, 1992; Unsöld & Li 2006).

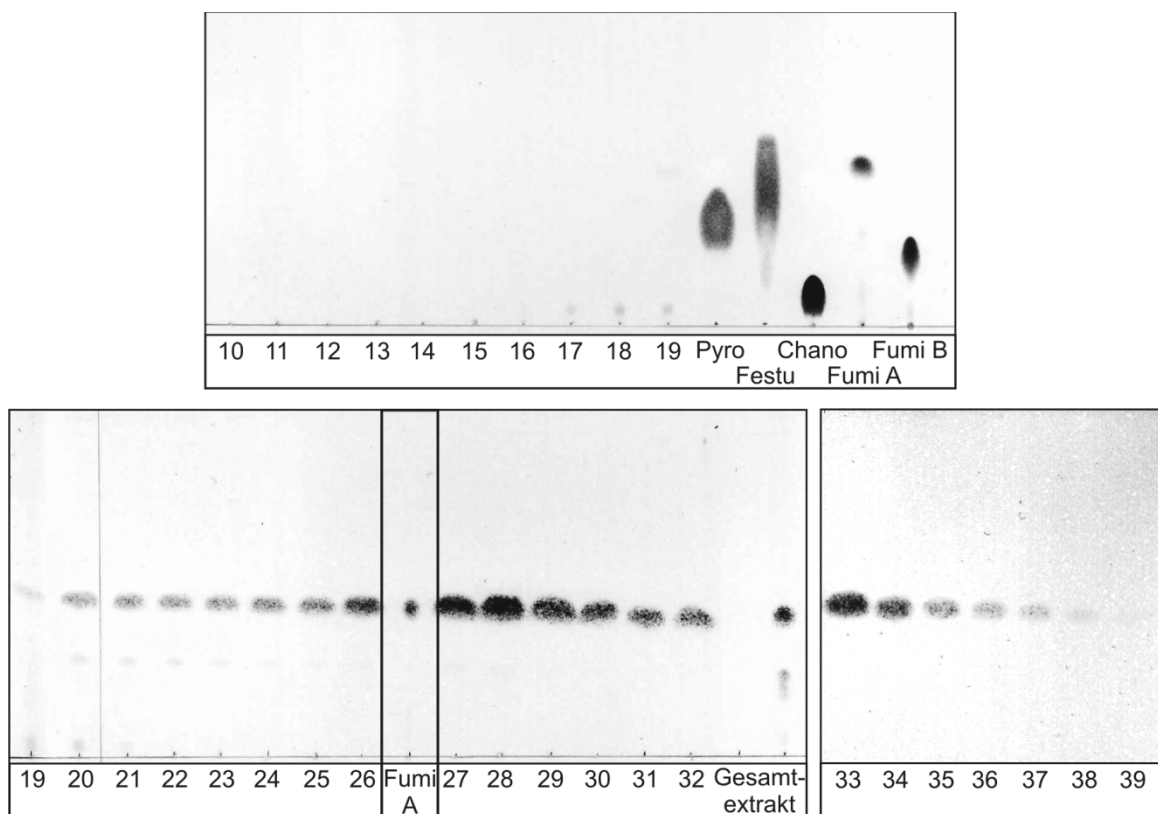


Abbildung 4-26: DC der Elutionsfraktionen von der Sephadex LH-20 Säule, visualisiert mit van Urk-Reagenz. (Pyro: Pyroclavin, Festu: Festuclavin, Chano: Chanoclavin-I, Fumi A: (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A, Fumi B: (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin B)

Mit dem (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A der vereinten Fraktionen 19-26 wurden Reaktionsansätze durchgeführt (Abbildung 4-28), da sich die Probe ohne Verunreinigungen bei der NMR-Analyse befand. Es zeigte sich, dass mit diesem (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A und FgaPT1 ein reproduzierbarer Umsatz von fast 100 % erreicht werden konnte, während mit dem (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A von Beate Wollinsky nur etwa 20 % umgesetzt wurden. Die Verunreinigungen hatten scheinbar keinen Einfluss auf den Umsatz und es kann ausgeschlossen werden, dass ein Teil reagierte, da sowohl mit Hitze-inaktiviertem (Abbildung 4-28A) als auch mit nativem FgaPT1 (Abbildung 4-28B) die Peakfläche der Verunreinigungen identisch ist. Die unterschiedlichen Umsätze kommen möglicherweise durch die verschiedene Art der Aufreinigung von (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A zustande (siehe auch Kapitel 5.1.4).

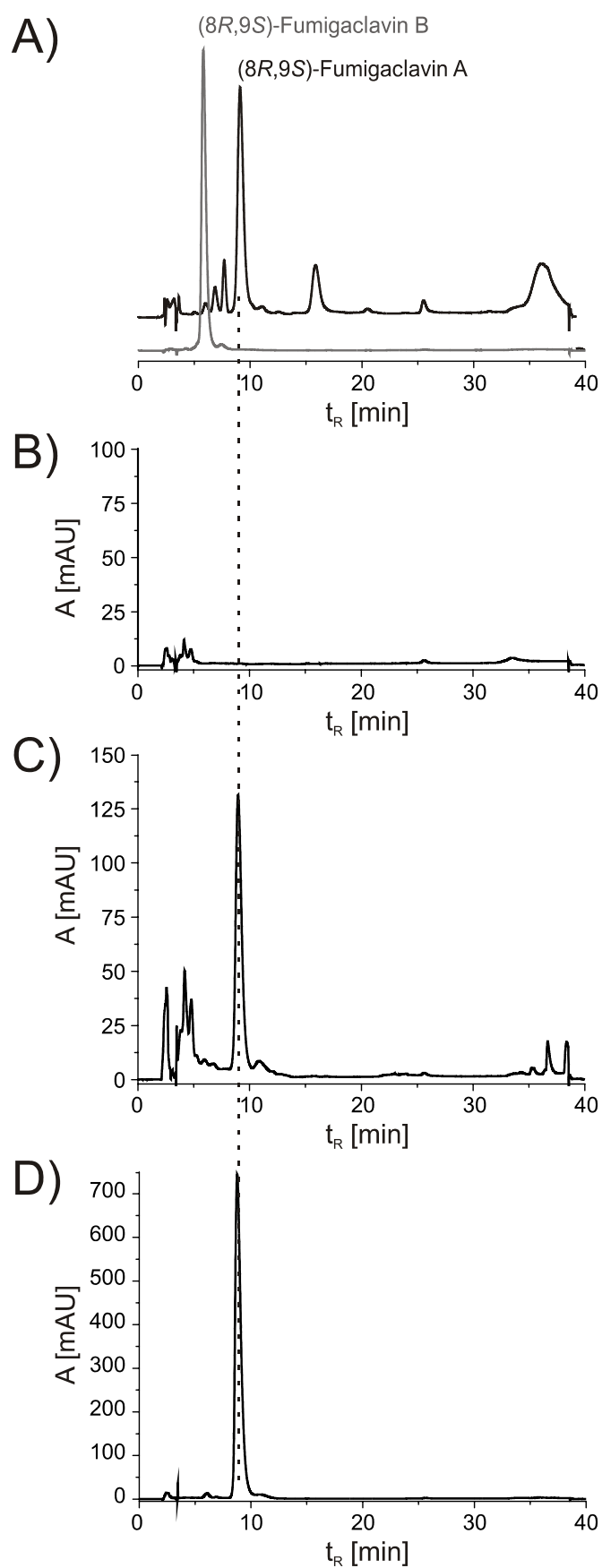


Abbildung 4-27: HPLC-Chromatogramme der vereinten Elutionsfraktionen: A) Standards, B) Fraktionen 1-18, C) Fraktionen 19-26 und D) Fraktionen 27-37.

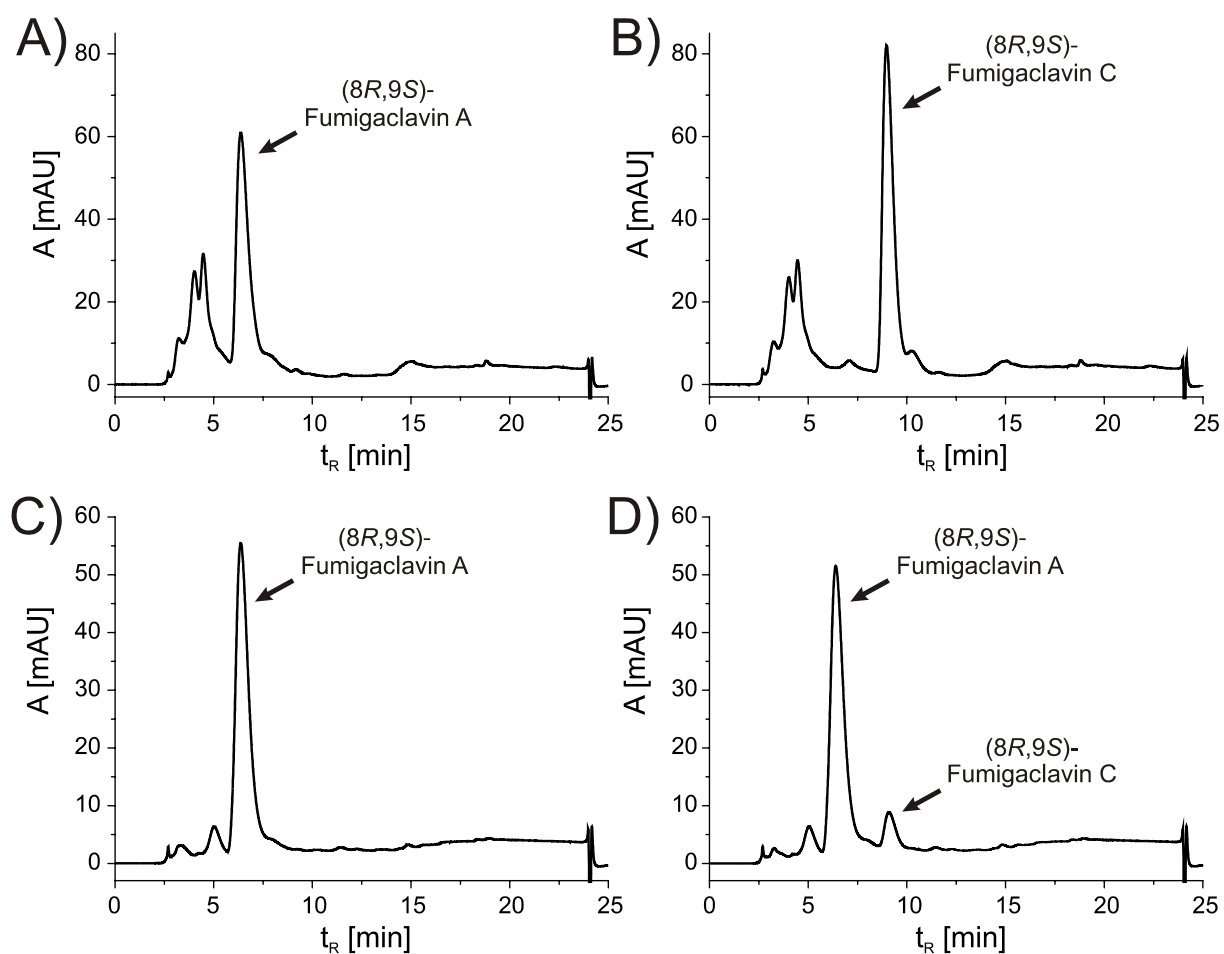


Abbildung 4-28: HPLC-Chromatogramme der Reaktionsansätze mit $(8R,9S)$ -Fumigaclavin A. A) mit dem neu isolierten $(8R,9S)$ -Fumigaclavin A und Hitze-inaktiviertem His₆-FgaPT1, B) mit dem neu isolierten $(8R,9S)$ -Fumigaclavin A und aktivem His₆-FgaPT1, C) mit $(8R,9S)$ -Fumigaclavin A von Beate Wollinsky und Hitze-inaktiviertem His₆-FgaPT1 und D) mit $(8R,9S)$ -Fumigaclavin A von Beate Wollinsky und aktivem His₆-FgaPT1.

4.3 Untersuchungen zur Ergotalkaloidbiosynthese in Pilzen der Familie Arthrodermataceae

4.3.1 Identifikation eines putativen Genclusters für die Biosynthese von Ergotalkaloiden in Pilzen der Familie Arthrodermataceae

Wie bereits in Kapitel 1.4 erwähnt, existieren sieben homologe Gene in Pilzen der Familie Trichocomaceae, z.B. *fgaPT2*, *fgaMT*, *fgaOx1*, *fgaCat*, *fgaDH*, *fgaOx3* und *fgaFS* in *A. fumigatus*, und in Pilzen der Familie Clavicipitaceae, z.B. *dmaW*, *easF*, *ccsA*, *easC*, *easD*, *easA* und *easG* in *C. purpurea*. Diese sieben Gene sind für die Bildung des gemeinsamen Strukturmerkmals, das tetrazyklische Ergolinringsystem, verantwortlich.

Mit Hilfe der abgeleiteten Proteinsequenzen der Gene des Ergotalkaloidgenclusters von *A. fumigatus* Af293 und dem Programm Protein BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) konnten jeweils fünf Proteine in *Arthroderma benhamiae* (*A. benhamiae*), *Arthroderma otae* (*A. otae*) und *Trichophyton verrucosum* (*T. verrucosum*) identifiziert werden, die hohe Sequenzidentitäten mit FgaPT2, FgaMT, FgaOx1, FgaCat und FgaDH aus *A. fumigatus* Af293 sowie weiteren Ergotalkaloidproduzenten aufwiesen (Tabelle 4-8).

Die Pilze *A. benhamiae*, *A. otae* und *T. verrucosum* gehören zu der Familie Arthrodermataceae und sind pathogene Dermatophyten, die keratinhaltige Wirtsstrukturen wie z.B. Fuß- oder Fingernägel infizieren. Ihre natürlichen Wirte sind Tiere, wie beispielsweise das Meerschweinchen bei *A. benhamiae*. Die Familie Arthrodermataceae zählt ebenso wie die Familien Trichocomaceae und Clavicipitaceae zu der Abteilung Ascomycota und der Unterabteilung Pezizomycotina und gehört derselben Unterklasse (Eurotiomycetidae) an wie die Familie Trichocomaceae. Beide unterscheiden sich aber in der Ordnung (Onygenales bei Arthrodermataceae bzw. Eurotiales bei Trichocomaceae).

Die Sequenzidentitäten der fünf identifizierten Proteine mit ihren Homologen in *A. fumigatus* und *C. purpurea* liegen zwischen 40 und 70 %. Untereinander weisen die Homologen von *A. benhamiae* und *A. otae* Sequenzidentitäten von 66 bis 92 % auf. Die Homologen von *A. otae* und *T. verrucosum* zeigen Sequenzidentitäten von 72 bis 92 % und die Homologen von *A. benhamiae* und *T. verrucosum* sogar Sequenzidentitäten von 80 bis 99 % zueinander.

Tabelle 4-8: Die homologen Proteine verschiedener Pilze der Familie Arthrodermataceae, die in die Bildung von Chanoclavin-I-Aldehyd involviert sind. Angegeben sind die *accession number*, die Länge der Proteine in Aminosäuren [AS] und die Sequenzidentitäten mit *Aspergillus fumigatus* (A.f.) sowie *Claviceps purpurea* (C.p.) in Prozent [%]. Zusätzlich sind die Sequenzidentitäten von *Arthroderma otae*, *Arthroderma benhamiae* (A.b.) und *Trichophyton verrucosum* (T.v.) untereinander

Proteinname für C.p. Proteinname für A.f.	DMATS FgaPT2	EasF/CpOrfB FgaMT	EasE/CpOx1/CcsA FgaOx1	EasC/CpCat FgaCat	EasD/CpOx2 FgaDH
<i>Arthroderma otae</i> CBS 113480	EEQ33236 446 AS 61 % mit A.f. 56 % mit C.p. 83 % mit A.b. 81 % mit T.v.	EEQ33234 340 AS 66 % mit A.f. 60 % mit C.p. 88 % mit A.b. 78 % mit T.v.	EEQ33235 612 AS 46 % mit A.f. 42 % mit C.p. 66 % mit A.b. 72 % mit T.v.	EEQ33232 482 AS 61 % mit A.f. 56 % mit C.p. 92 % mit A.b. 92 % mit T.v.	EEQ33233 246 AS 70 % mit A.f. 60 % mit C.p. 82 % mit A.b. 81 % mit T.v.
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371	EFE37121 385 AS 54 % mit A.f. 51 % mit C.p. 96 % mit T.v.	EFE37119 340 AS 65 % mit A.f. 59 % mit C.p. 87 % mit T.v.	EFE37120 500 AS 47 % mit A.f. 42 % mit C.p. 80 % mit T.v.	EFE37117 478 AS 61 % mit A.f. 55 % mit C.p. 99 % mit T.v.	EFE37118 246 AS 64 % mit A.f. 60 % mit C.p. 85 % mit T.v.
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517	EFE43383 375 AS 53 % mit A.f. 50 % mit C.p.	EFE43381 382 AS 58 % mit A.f. 53 % mit C.p.	EFE43382 604 AS 44 % mit A.f. 40 % mit C.p.	EFE43379 478 AS 61 % mit A.f. 56 % mit C.p.	EFE43380 265 AS 66 % mit A.f. 59 % mit C.p.

Die Homologen zu den fünf identifizierten Proteinen sind z.B. in *A. fumigatus* in die Bildung von Chanoclavin-I-Aldehyd aus L-Tryptophan involviert. Zu den Proteinen, die für die weitere Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd verantwortlich sind, z.B. FgaOx3 und FgaFS in *A. fumigatus* (Kapitel 4.1), konnten keine Homologen in den

Genomen der drei Pilze der Familie Arthrodermataceae gefunden werden. Auch fanden sich keine Homologen zu den Proteinen, die für die Schritte nach der Bildung des tetrazyklischen Ergolinringsystems zuständig sind und die sich bei den Pilzen der Familie Trichocomaceae und der Familie Clavicipitaceae voneinander unterscheiden. Die Gene, die für die fünf identifizierten Proteine codieren, liegen zusammenhängend in einem Cluster vor, ohne von anderen Genen unterbrochen zu werden. Sowohl die Reihenfolge als auch die Orientierung dieser Gene ist in den drei Pilzen *A. benhamiae*, *A. otae* und *T. verrucosum* identisch (Abbildung 4-29).

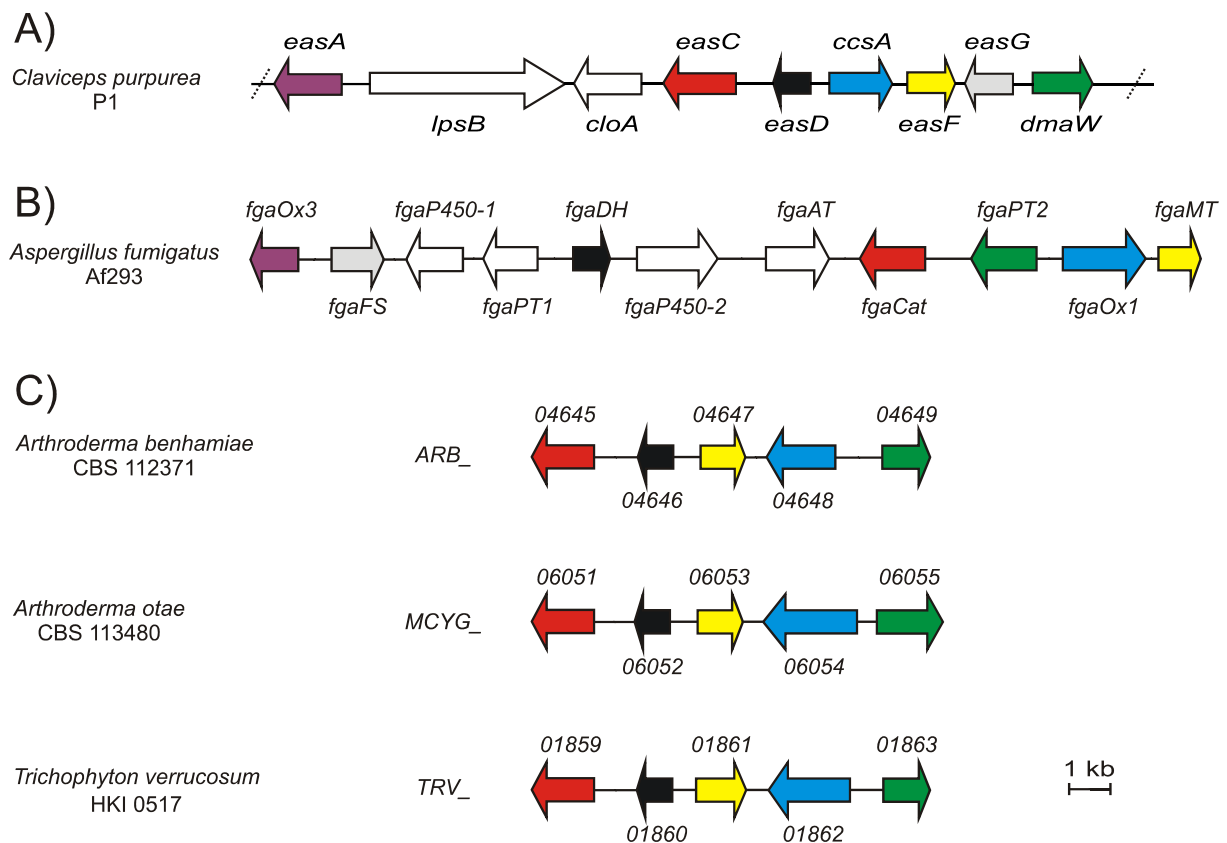


Abbildung 4-29: Biosynthetische Gencluster verschiedener Pilze für die Ergotalkaloidbiosynthese. A) Teil des Ergotalkaloidgenclusters aus *Claviceps purpurea*, B) das Fumigaclavin C-Gencluster aus *Aspergillus fumigatus* und C) ein putatives Ergotalkaloidgencluster aus drei Pilzen der Familie Arthrodermataceae. Die jeweils homologen Gene sind in allen Clustern mit der gleichen Farbe markiert.

Dies führte zu der Hypothese, dass die Schritte bis zum Chanoclavin-I-Aldehyd in den Pilzen der Familie Arthrodermataceae mit denen in *A. fumigatus* und *C. purpurea* identisch sein könnten. Die darauf folgenden Schritte müssen sich jedoch in den einzelnen Familien unterscheiden. Entweder ist in der Familie Arthrodermataceae die Biosynthese an dieser Stelle mit Chanoclavin-I-Aldehyd beendet, oder Chanoclavin-I-Aldehyd wird von Proteinen weiter umgesetzt, zu denen es keine Homologen in den

Pilzen der Familien Trichocomaceae und Clavicipitaceae gibt. Dann würde diese Substanz aber sehr wahrscheinlich nicht den Ring D des tetrazyklischen Ergolinringsystems besitzen, wie er in Festuclavin und Agroclavin vorliegt, da keine Homologen zu den dafür verantwortlichen Proteinen gefunden wurden. In der Literatur gibt es bisher keine Hinweise zu Ergotalkaloiden oder deren Vorläufern in Pilzen der Familie Arthrodermataceae.

Die detailliertere Betrachtung der NCBI-Einträge der fünf Proteine in *A. benhamiae*, *A. otae* und *T. verrucosum* ergab, dass einige der Proteine starke Unterschiede zueinander aufwiesen, wie z.B. die Anzahl der Aminosäuren bei den Homologen zu FgaPT2 und FgaOx1. Andere Sequenzen waren dagegen nahezu identisch, z.B. die Homologen zu FgaCat (Tabelle 4-8). Da die Proteinsequenzen automatisch während der Sequenzierung ORF basiert und ohne Berücksichtigung homologer Sequenzen vorhergesagt wurden, lies dies den Schluss zu, dass die ORF basierten Vorhersagen möglicherweise falsch sind. Daraufhin wurden die Gensequenzen in Bezug auf Länge und Intron/Exon-Struktur genauer analysiert. Durch den Sequenzvergleich jedes Gens mit seinen entsprechenden Homologen aus den anderen Ergotalkaloidproduzenten konnten die Intron/Exon-Strukturen vereinheitlicht werden und eine höhere Sequenzidentität der Proteine untereinander und mit denen aus *A. fumigatus* Af293 erreicht werden (Tabelle 4-9). Probleme gab es bei der Analyse der Gene von *T. verrucosum*. In der Gensequenz des Homologs zu *fgaPT2* befand sich an einer Stelle ein Stopcodon (TAG) statt wie bei sämtlichen anderen Pilzen der Familie Arthrodermataceae das Codon CAG. Das Stopcodon würde zu einem um 30 AS verkürzten Protein führen. Bei dem Homolog zu *fgaOx1* lag ein zusätzliches Adenin vor, das zu einer Verschiebung des Leserahmens führen würde. Diese Unterschiede könnten tatsächlich im Genom vorliegen und während der Evolution entstanden sein, oder aber als Fehler bei der Sequenzierung. Für die Bestimmung der Sequenzidentitäten wurde davon ausgegangen, dass es sich um Sequenzierungsfehler handelt und die Sequenzen wurden korrigiert.

Für die Pilze *Arthroderma gypseum* (*A. gypseum*), *Trichophyton equinum* (*T. equinum*), *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) und *Trichophyton tonsurans* (*T. tonsurans*), war die Sequenzierung noch nicht abgeschlossen und bei NCBI noch keine putativen Proteinsequenzen hinterlegt. Daher wurden die Gesamtgenome mit Hilfe von *genomic* BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?organism=fungi) auf die Existenz der fünf Gene analysiert. Dabei wurden die überarbeiteten Gensequenzen von *A. benhamiae* verwendet. In allen vier Genomsequenzen konnten Homologe zu den fünf Genen identifiziert werden (Tabelle 4-9). Das Gencluster befand sich jedoch nur bei *T. tonsurans* auf einem Contig, bei *A. gypseum*, *T. equinum* und *T. rubrum* waren die Gene auf zwei Contigs verteilt. Bei

den Sequenzvergleichen mit den Homologen zeigte sich, dass es anscheinend zu keiner Überschneidung der Contigs kam und die Sequenzen auf den Contigs auch nicht direkt aneinander anknüpfen. Dadurch fehlen bei der Gensequenz des Homologs zu *fgaPT2* in *A. gypseum* und auch in *T. rubrum* sowie bei der Gensequenz des Homologs zu *fgaOx1* in *T. equinum* Basen, so dass keine Proteinsequenz abgeleitet werden konnte. Weiterhin fehlten in *T. equinum* in der Sequenz des Homologs zu *fgaDH* über das gesamte Gen verteilt insgesamt 8 Basen im Vergleich zu seinen Homologen, die zu einer Verschiebung des Leserahmens führen. In *T. tonsurans* befand sich in der Gensequenz des Homologs zu *fgaCat* außerdem ein zusätzliches Adenin, das aber wie bei dem Homolog zu *fgaOx1* von *T. verrucosum* für die Bestimmung der Sequenzidentitäten als vermeintlicher Sequenzierungsfehler behandelt wurde.

Tabelle 4-9: Die Sequenzidentitäten [%] A) zwischen den überarbeiteten homologen Proteinsequenzen von *Arthroderma otae*, *Arthroderma benhamiae* (A.b.) und *Trichophyton verrucosum* (T.v.) sowie mit *Aspergillus fumigatus* (A.f.) und B) die Sequenzidentitäten [%] der vorhergesagten Proteine aus den noch nicht vollständigen Genomsequenzen mit *Aspergillus fumigatus* und den überarbeiteten Proteinsequenzen von *Arthroderma benhamiae*. In Klammern sind die GenBank-Einträge angegeben, unter denen die Contigs hinterlegt sind, auf denen die codierenden Bereiche der Proteine liegen.

Proteinname für A.f.	FgaPT2	FgaMT	FgaOx1	FgaCat	FgaDH
A)					
<i>Arthroderma otae</i> CBS 113480 (ABVF01000200.1)	60 % mit A.f. 92 % mit A.b. 92 % mit T.v.	66 % mit A.f. 88 % mit A.b. 87 % mit T.v.	46 % mit A.f. 77 % mit A.b. 77 % mit T.v.	61 % mit A.f. 92 % mit A.b. 92 % mit T.v.	70 % mit A.f. 89 % mit A.b. 86 % mit T.v.
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 (ABSU01000001.1)	61 % mit A.f. 99 % mit T.v.	65 % mit A.f. 98 % mit T.v.	45 % mit A.f. 97 % mit T.v.	62 % mit A.f. 99 % mit T.v.	69 % mit A.f. 96 % mit T.v.
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 (ACYE01000098.1)	61 % mit A.f.	65 % mit A.f.	45 % mit A.f.	63 % mit A.f.	66 % mit A.f.
B)					
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893 (ABQE01000192.1 und ABQE01000193.1)	unvollständige Genomsequenz	65 % mit A.f. 90 % mit A.b.	46 % mit A.f. 85 % mit A.b.	62 % mit A.f. 95 % mit A.b.	69 % mit A.f. 90 % mit A.b.
<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 (ABWI01000767.1 und ABWI01000768.1)	60 % mit A.f. 98 % mit A.b.	65 % mit A.f. 96 % mit A.b.	unvollständige Genomsequenz	62 % mit A.f. 96 % mit A.b.	Leserahmen verschoben
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS 118892 (ACPH01000395.1 und ACPH01000396.1)	unvollständige Genomsequenz	65 % mit A.f. 97 % mit A.b.	45 % mit A.f. 94 % mit A.b.	62 % mit A.f. 97 % mit A.b.	70 % mit A.f. 96 % mit A.b.
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 (ACPI01000892.1)	60 % mit A.f. 98 % mit A.b.	65 % mit A.f. 96 % mit A.b.	45 % mit A.f. 94 % mit A.b.	61 % mit A.f. 96 % mit A.b.	68 % mit A.f. 96 % mit A.b.

4.3.2 Charakterisierung der Chanoclavin-I-Dehydrogenase ChaDH aus *Arthroderma benhamiae*

4.3.2.1 Klonierung und Expression des Gens *ARB_04646* aus *A. benhamiae*

Mit dem Gen *ARB_04646* sollte getestet werden, ob das Gencluster tatsächlich in die Biosynthese von Ergotalkaloiden oder ihren Vorläufern involviert ist und Chanoclavin-I-Aldehyd gebildet werden kann. Im Laufe dieser Dissertation konnte bereits demonstriert werden, dass das Homolog FgaDH aus *A. fumigatus* in Anwesenheit von NAD⁺ die Oxidation der Alkoholgruppe von Chanoclavin-I zu einer Aldehydgruppe katalysiert (Kapitel 4.1.1).

Für das Gen wurden zwei Exons mit einer Länge von 598 bzw. 143 bp und ein Intron mit einer Länge von 117 bp vorausgesagt. Das abgeleitete Genprodukt mit dem GenBank-Eintrag EFE37118 besteht demnach aus 246 Aminosäuren und besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 26,2 kDa. EFE37118 zeigt signifikante Sequenzähnlichkeit zu seinen Homologen in den anderen Pilzen der Familie Arthrodermataceae sowie zu denen in *A. fumigatus* und *C. purpurea* (Tabelle 4-8). Das Programm DNASIS berechnet eine Sequenzidentität von 64 % mit FgaDH aus *A. fumigatus* und 60 % mit EasD aus *C. purpurea*. Zu Beginn wurde das Gen *ARB_04646* mittels Fusions-PCR nach dem NCBI-Eintrag amplifiziert und kloniert. Das Agarosegel zur Amplifikation der beiden Exons und das Klonierungskonstrukt pCW 15 sowie das Expressionskonstrukt pCW16 sind in Abbildung 4-30 gezeigt.

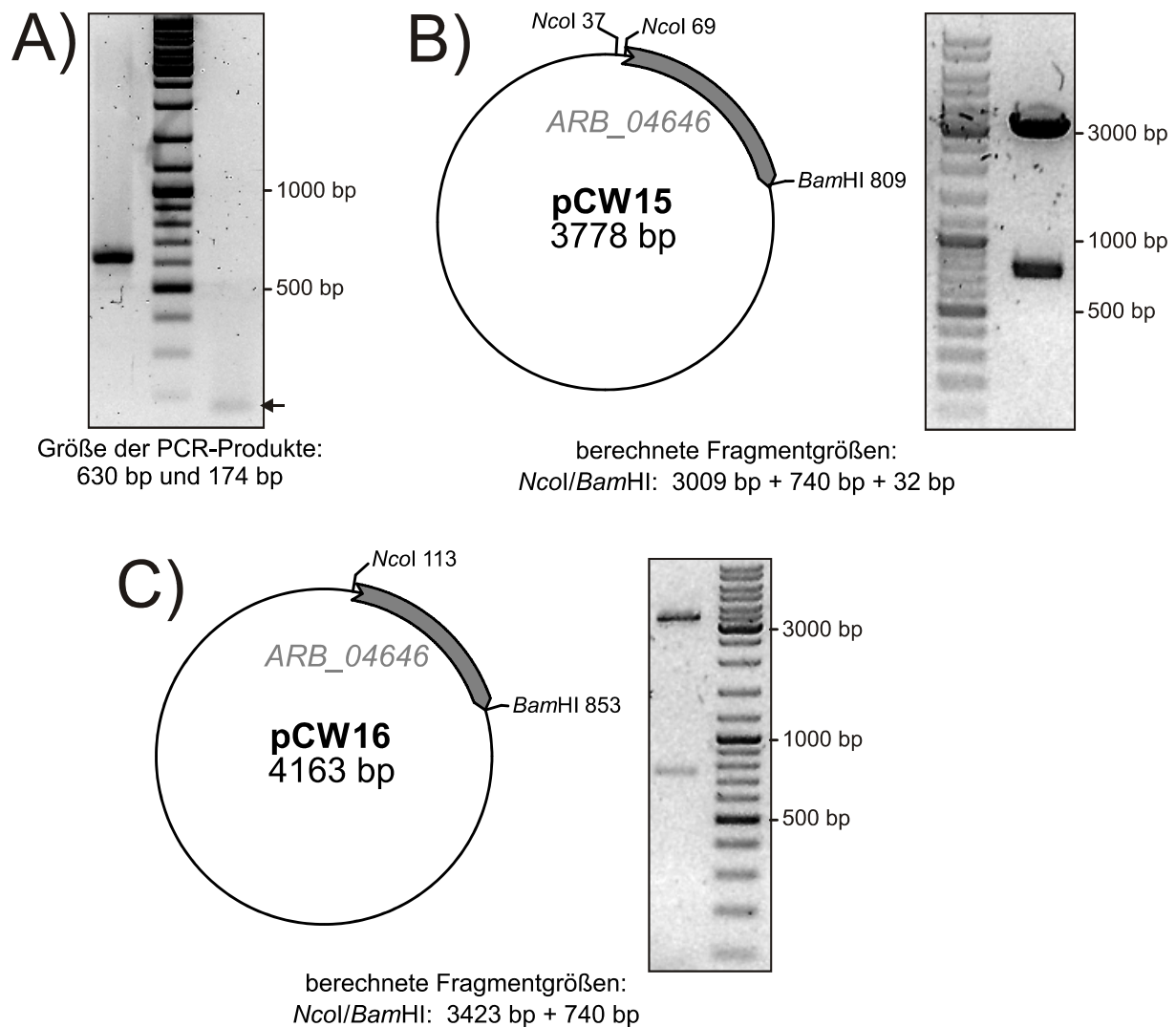


Abbildung 4-30: A) Agarosegel zur Amplifikation der beiden Exons von *ARB_04646* aus gDNA von *A. benhamiae*. B) Das Klonierungskonstrukt pCW15 (*ARB_04646* in pGEM-T Easy) und C) das Expressionskonstrukt pCW16 (*ARB_04646* in pQE-60) mit den zur Umklonierung verwendeten Schnittstellen sowie die Agarosegele zu den Restriktionen der Plasmide mit diesen Restriktionsenzymen. Zusätzlich sind die zu erwartenden Fragmentgrößen nach der Restriktion aufgeführt.

Jedoch konnte keine Überexpression des Proteins nach Transformation von *E. coli* mit dem Expressionskonstrukt pCW16 nachgewiesen werden. Die daraufhin durchgeführte Analyse der Aminosäuresequenz von EFE37118 und der Vergleich mit seinem Homolog FgaDH aus *A. fumigatus* zeigten, dass bei EFE37118 18 Aminosäuren fehlen, die bei FgaDH durch den Anfangsbereich des zweiten Exons codiert werden (Abbildung 4-31). Das lässt darauf schließen, dass das Intron bei EFE37118 eigentlich kürzer sein müsste.

			20			40			
<i>A. fumigatus</i>	MASVESRIIA	ITGGASGIGA	ATCRLLAERG	AAVLCVCDIS	PKNFDDLKIS	50			
<i>A. benhamiae</i>	MASVSSKIFA	ITGGASGIGA	ATCRLLAKRG	AATLCVGDLC	SENMKQLEND	50			
		60		80		100			
<i>A. fumigatus</i>	IKKINPSTKV	HCATVDVTSS	VEVRQWIEGI	ISDFGDLHGA	VNAAGIAQGA	100			
<i>A. benhamiae</i>	IKEINPNTKV	HCTVLDVSSS	SNVDEWIKDI	ITTFGDLHGA	ANIAGIAQGA	100			
		120		140					
<i>A. fumigatus</i>	GMRNTPTIAE	EVDEEWTRIM	NTNLNGVFYC	TREEVRAMKG	LPAT - - DRS	147			
<i>A. benhamiae</i>	GLRQAPTILE	EDDQQWKKVF	QVNLDGVLYS	TRAQVRAMKE	SSSTNPGDRS	150			
		160		180		200			
<i>A. fumigatus</i>	IVNVGSIASV	SHMPDVYAYG	TSKGACAYFT	TCVAADAFPL	GIRINNVSPG	197			
<i>A. benhamiae</i>	IVNVASIASM	SHMPDVFAVG	TSKAGCAYFT	TCVSQDVMPF	GIRANTVSPG	200			
		220		240					
<i>A. fumigatus</i>	VTNTPMLPQF	APMAKTFEEL	EESYKKEGLS	LIEAEDVART	IVWLLSEDSR	247			
<i>A. benhamiae</i>	ITRTPMLPRF	VPNAKTQEEV	EETKYKEGFS	VIEADDVART	IVWLLSEDSR	250			
		260							
<i>A. fumigatus</i>	PVFGANINVG	ACMP	261						
<i>A. benhamiae</i>	PVFGANINVG	ACMP	264						

Abbildung 4-31: Aminosäuresequenzvergleich von ChaDH aus *Arthroderma benhamiae* (*A. benhamiae*) mit FgaDH aus *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*). Die Aminosäuren 200 bis 217, die bei EFE37118 im Vergleich zu ChaDH fehlen, sind grau hinterlegt.

Daraufhin wurde die Gensequenz mit einer an *fgaDH* angepassten Intron/Exon-Struktur amplifiziert und kloniert. Das Gen besteht nun aus zwei Exons mit 598 bzw. 197 bp Länge sowie einem verkürzten Intron von 63 bp Länge. Das Protein hat damit eine Größe von 264 Aminosäuren, die fast identisch ist mit der der anderen Homologen (261 bis 265 Aminosäuren). Die Sequenzidentität mit FgaDH aus *A. fumigatus* steigt von 64 % auf 69 %. Das theoretische Molekulargewicht beträgt 28,2 kDa. Die neue Intron/Exon-Struktur wurde später von Christoph Heddergott (Arbeitsgruppe Prof. Brakhage, HKI, Jena) durch Amplifikation der Sequenz aus cDNA von *A. benhamiae* CBS 112371 bestätigt. Um die korrigierte mRNA-Sequenz und das daraus resultierende Protein von dem Eintrag für EFE37118 in der NCBI-Datenbank zu unterscheiden, wird im Folgenden der Name ChaDH für das neue Protein verwendet.

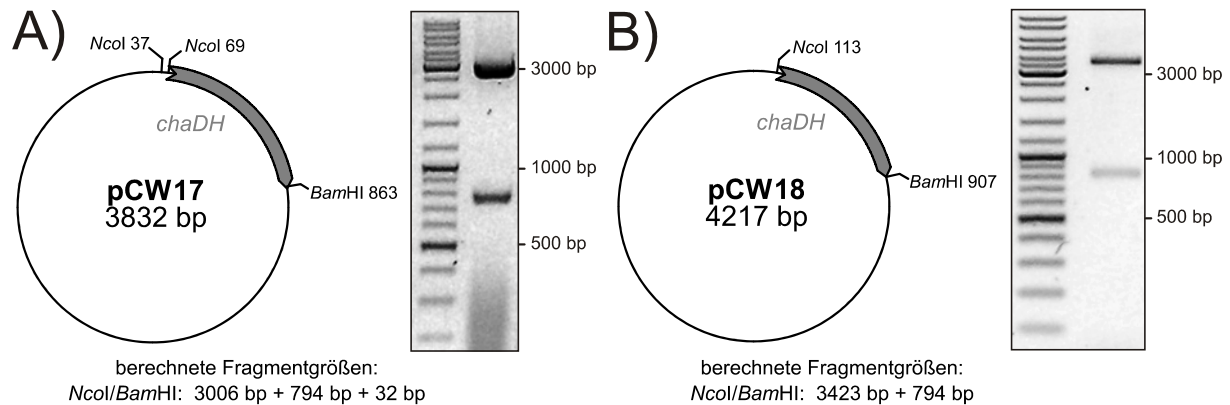


Abbildung 4-32: A) Das Klonierungskonstrukt pCW17 (*chaDH* in pGEM-T Easy) und B) das Expressionskonstrukt pCW18 (*chaDH* in pQE-60) mit den zur Umklonierung verwendeten Schnittstellen sowie die Agarosegele zu den Restriktionen der Plasmide mit diesen Restriktionsenzymen. Zusätzlich sind die zu erwartenden Fragmentgrößen nach der Restriktion aufgeführt.

Da auch die neu vorhergesagte codierende Region ein Intron enthält, musste das Gen *chaDH* mittels Fusions-PCR aus gDNA von *A. benhamiae* amplifiziert werden. Dazu wurde in der 1. PCR-Runde ein 630 bp langes Fragment mit den Primern *chaDH_1_for* und *chaDH_2* und ein 228 bp langes Fragment mit den Primern *chaDH_3* und *chaDH_4_rev* amplifiziert. Für die Herstellung des Klonierungskonstrukts pCW17 folgte die Ligation des 812 bp langen Fusionsprodukts in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy. Die Umklonierung des 794 bp langen *NcoI*-*BamHI* Fragments in den Vektor pQE-60 resultierte in dem Expressionskonstrukt pCW18 (Abbildung 4-32). Die Expression erfolgte in *E. coli* XL1-Blue MRF' Zellen mit 0,2 mM IPTG bei 37 °C für 16 h. Es konnten 3 mg ChaDH-His₆ aus einem Liter Bakterienkultur aufgereinigt werden (Abbildung 4-33). Das beobachtete Molekulargewicht von etwa 30 kDa stimmt mit dem theoretischen Molekulargewicht von 29,5 kDa für ChaDH-His₆ überein.

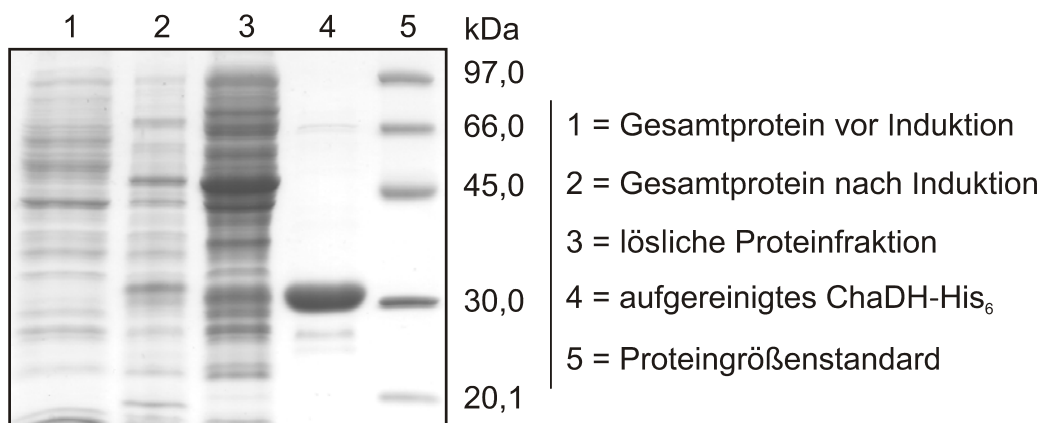


Abbildung 4-33: SDS-PAGE der Aufreinigung von ChaDH-His₆. Es wurde ein 15 % Trenngel verwendet.

4.3.2.2 Aktivitätstests mit ChaDH-His₆

Um die Enzymaktivität von ChaDH zu testen, wurde das aufgereinigte Protein mit 1 mM Chanoclain-I und 5 mM NAD⁺ für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Als Positiv-Kontrolle diente ein Ansatz in dem FgaDH aus *A. fumigatus* statt ChaDH verwendet wurde. Die Analyse der Reaktionen erfolgte nach Extraktion mit Dichlormethan mittels HPLC (Abbildung 4-34). In beiden HPLC-Chromatogrammen konnte neben dem Substratpeak ein zusätzlicher Produktpeak detektiert werden, der eine identische Retentionszeit von 10,6 min aufwies. Der Umsatz mit ChaDH von 24 % war höher als der mit FgaDH von 15 %. Der Produktpeak erschien nicht in den Kontrollansätzen mit Hitze-inaktiviertem ChaDH-His₆ bzw. FgaDH-His₆. Weiterhin war die katalysierte Reaktion an die Anwesenheit von NAD⁺ gebunden, da Chanoclain-I weder in Abwesenheit von NAD⁺ noch mit anderen Protonenakzeptoren wie NADP⁺, FMN oder FAD umgesetzt wurde.

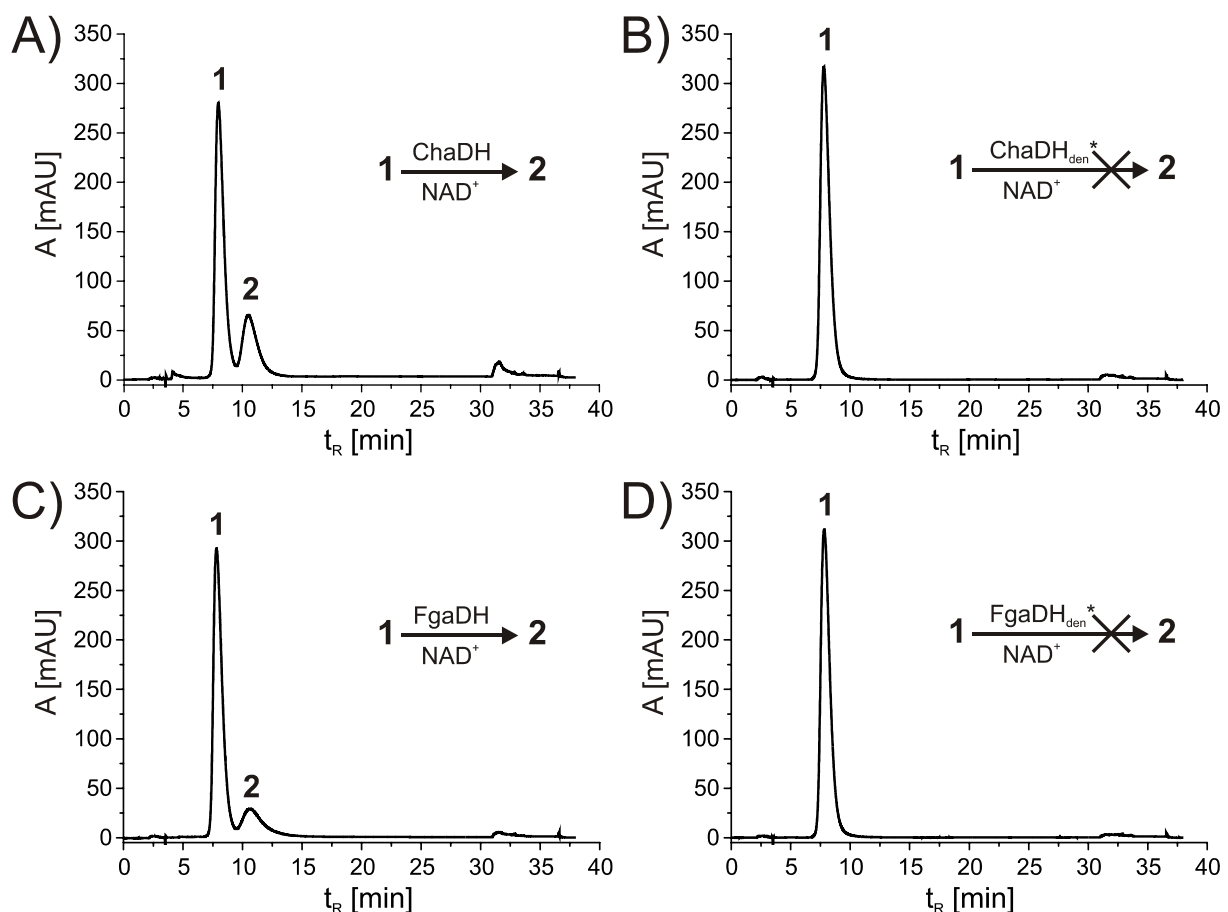


Abbildung 4-34: HPLC-Chromatogramme der Inkubationsgemische mit Chanoclain-I A) mit ChaDH-His₆, B) mit Hitze-inaktiviertem ChaDH-His₆, C) mit FgaDH-His₆ und D) mit Hitze-inaktiviertem FgaDH-His₆. Die Reaktionsansätze enthielten 1 mM Chanoclain-I, 5 mM NAD⁺ und 5 µg ChaDH-His₆ bzw. FgaDH-His₆. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 16 h. Die Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 296 nm aufgenommen. (1: Chanoclain-I, 2: Chanoclain-I-Aldehyd, den*: das Protein wurde für 30 min bei 100 °C denaturiert)

4.3.2.3 Strukturaufklärung des enzymatischen Produkts mit ChaDH-His₆

Für die Strukturaufklärung des enzymatischen Produkts wurde die Reaktion in einem 20 ml Maßstab angesetzt. Nach 2 Stunden konnte ein Umsatz von etwa 28 % erreicht werden. Die Isolierung des Produkts erfolgte mittels HPLC, wobei die verwendeten Fließmittel 0,5 % (v/v) TFA enthielten. Das verbliebene Substrat im Reaktionsansatz wurde ebenfalls auf diese Weise isoliert. Um den Vergleich der NMR-Spektren mit den Daten in der Literatur zu erleichtern, wurde nach der Isolierung sowohl das enzymatische Produkt als auch das Substrat mit Natriumcarbonat in die freie Base überführt. Die Aufklärung der Struktur erfolgte mittels Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie. Das MS-Spektrum und die ¹H-NMR-, DQF-COSY-, HSQC- und NOESY-Spektren des Produkts befinden sich im Anhang (Abbildung 7-37 bis Abbildung 7-47). Aufgrund der geringen Produktmenge konnten weder ein ¹³C- noch ein HMBC-Spektrum gemessen werden. Die aufgelisteten ¹³C-NMR-Daten wurden aus dem HSQC-Spektrum abgeleitet. Daher ist die Zuordnung der ¹³C-NMR-Signale unvollständig. Von dem isolierten Substrat Chanoclain-I wurde ein ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen (Abbildung 7-48 im Anhang). Die Tabelle 4-10 zeigt die Zuordnung der ¹³C- und ¹H-NMR-Signale des Produkts und Substrats.

Der Vergleich der ¹H-NMR-Signale von Substrat und Produkt zeigt deutlich, dass das Signal für CH₂OH bei 4,15 ppm im Spektrum des Produkts nicht mehr vorhanden ist und stattdessen ein Signal für ein Aldehydproton bei 9,48 ppm vorliegt. Das beweist, dass Chanoclain-I durch ChaDH zu seinem Aldehyd oxidiert wurde. Die NMR-Daten des mit ChaDH gebildeten Chanoclain-I-Aldehyds stimmen gut mit den NMR-Daten des Chanoclain-I-Aldehyds aus der FgaDH-Inkubation überein (Kapitel 4.1.1.4). Das NOESY-Spektrum beweist, dass die Aldehydgruppe und das olefinische Methinproton an C-9 in *cis*-Konfiguration vorliegen.

Das Ergebnis der Massenspektrometrie bestätigte ebenfalls die Struktur des Produkts als Chanoclain-I-Aldehyd. Im HR-ESI-MS-Spektrum konnte ein [M+1]⁺ Ion bei *m/z* = 255,1451 (berechneter Wert: 255,1497) detektiert werden. Damit ist bewiesen, dass ChaDH eine Chanoclain-I-Dehydrogenase ist, welche die Oxidation von Chanoclain-I zu Chanoclain-I-Aldehyd in Anwesenheit von NAD⁺ katalysiert (Abbildung 4-35).

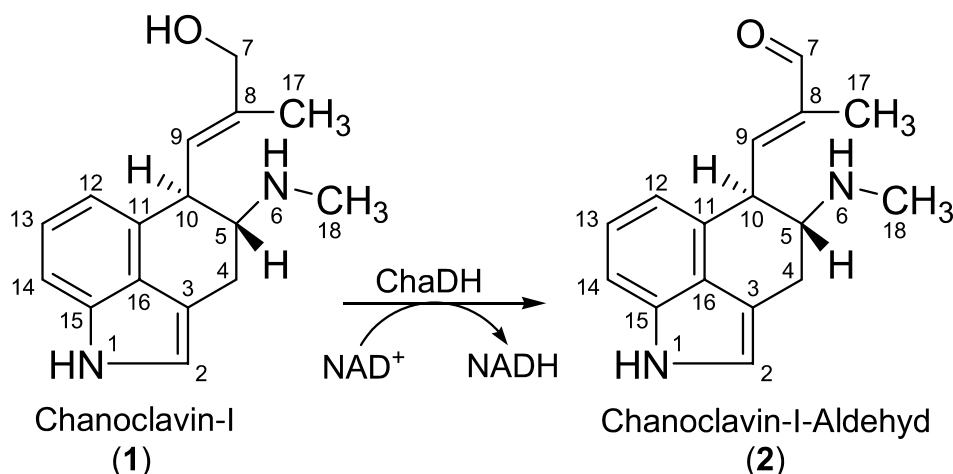


Abbildung 4-35: Die Reaktion von Chanoclavin-I zu Chanoclavin-I-Aldehyd.

Tabelle 4-10: ^1H -NMR-Daten für Chanoclavin-I und ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten für Chanoclavin-I-Aldehyd aus dem Inkubationsgemisch mit ChaDH in CDCl_3 .

Position	Chanoclavin-I	Chanoclavin-I-Aldehyd	
	δ_{H} [ppm] Multiplizität (J [Hz])	δ_{H} [ppm] Multiplizität (J [Hz])	δ_{C} [ppm]
1	7,98 brs	8,01 br s	-
2	6,92 brs	6,96 br s	118,73
4 $_{\alpha}$	2,85 dd (14,9; 9,1)	2,89 dd (15,3; 7,2)	25,40
4 $_{\beta}$	3,32 dd (15,0; 4,1)	3,27 dd (15,3; 4,0)	
5	3,01 td (8,7; 4,2)	3,15 td (6,9; 4,2)	60,32
6	-	-	-
7	4,15 s	9,48 s	194,96
9	5,44 d (9,8)	6,49 d (10,1)	153,88
10	4,02 brt (9,1)	4,31 dd (10,0; 6,7)	43,34
12	6,74 d (7,1)	6,71 d (7,1)	116,60
13	7,12 t (7,6)	7,14 t (7,6)	123,10
14	7,19 d (8,1)	7,25 d (7,5)	109,37
17	1,88 br s	2,00 d (0,9)	9,40
18	2,56 s	2,52 s	33,51

4.3.2.4 Biochemische Eigenschaften von ChaDH-His₆ und Bestimmung der kinetischen Parameter

Mittels Größenausschlusschromatographie konnte die molekulare Masse des rekombinanten ChaDH-His₆ in seinem aktiven Zustand auf 128 kDa bestimmt werden. Das weist darauf hin, dass ChaDH, ebenso wie sein Homolog FgaDH aus *A. fumigatus*, als Homotetramer vorliegt (Kapitel 4.1.1.5). Die Produktbildung lag bei einem 100 μl Reaktionsansatz bis 1,5 μg Protein bzw. 12 min Inkubationszeit im linearen Bereich (Abbildung 4-36).

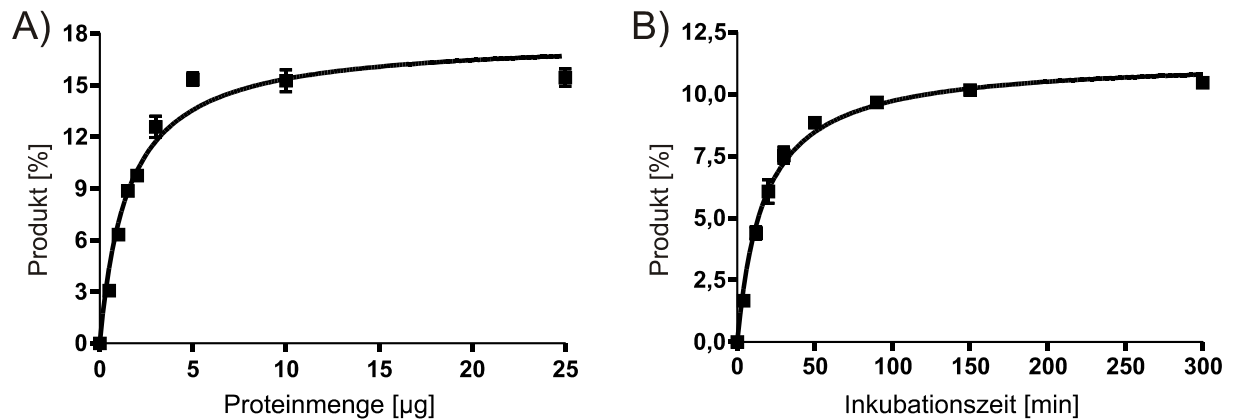


Abbildung 4-36: Abhängigkeit der Produktbildung der ChaDH-Reaktion von A) der Proteinmenge und B) der Inkubationszeit. Die Reaktionsansätze (100 μl) enthielten 1 mM Chanoclain-I, 5 mM NAD^+ und A) unterschiedliche Mengen ChaDH-His₆, die Inkubationsdauer war 10 min bzw. B) 1 μg ChaDH-His₆, die Inkubationszeit variierte.

Die Reaktion folgt der Michaelis-Menten Kinetik und der K_M -Wert konnte anhand des Hanes-Woolf Diagramms als 90 μM für Chanoclain-I bzw. 0,36 mM für NAD^+ bestimmt werden (Abbildung 4-37). Die K_M -Werte betrugen damit jeweils nur ein Drittel der K_M -Werte von FgaDH. Der Mittelwert aus den beobachteten maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (v_{max}) betrug $385 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, die Wechselzahl dementsprechend $0,76 \text{ s}^{-1}$.

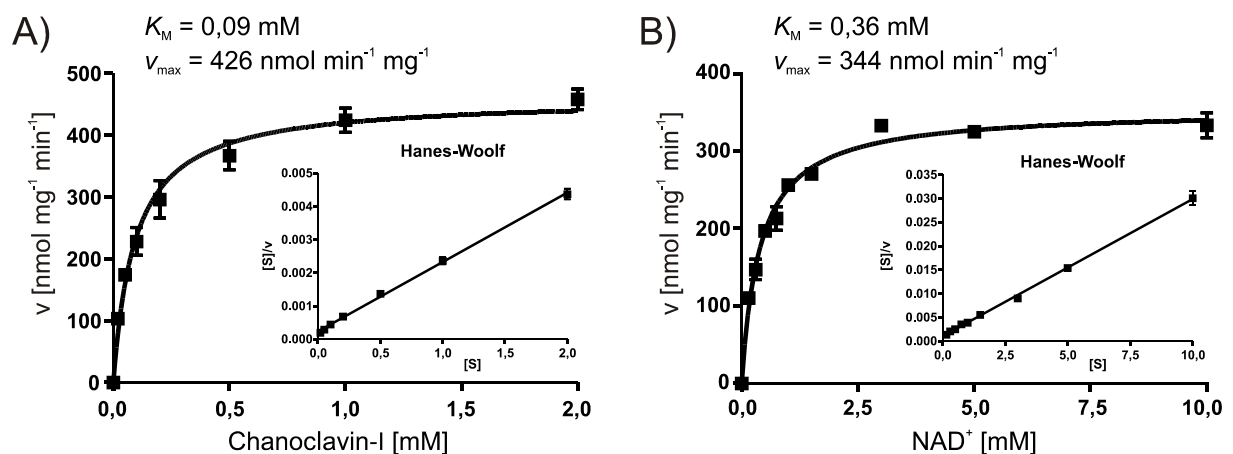


Abbildung 4-37: Bestimmung der kinetischen Parameter der von ChaDH katalysierten Reaktion mit Hilfe des Hanes-Woolf Diagramms für A) Chanoclain-I und B) NAD^+ .

Die Versuche zu der Ionenabhängigkeit von der durch ChaDH katalysierten Reaktion (Abbildung 4-38) zeigten, dass die Inkubation von Chanoclain-I mit ChaDH-His₆ und NAD^+ in der Anwesenheit von EDTA, im Vergleich zu der Inkubation ohne EDTA oder Metallionen, zu einer Reduzierung der Enzymaktivität auf 71 % führt. Die Zugabe von Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ oder Na^+ zu dem Reaktionsgemisch änderte die Enzymaktivität im

Vergleich zu der Kontrolle ohne Metallionen nur geringfügig. Die Zugabe von Ni^{2+} , Mn^{2+} bzw. Co^{2+} resultierte in einer Enzymaktivität von 73, 35 bzw. 31 % der Aktivität der Kontrollreaktion. Nach Zugabe von Fe^{2+} , Zn^{2+} oder Cu^{2+} konnte nahezu keine Produktbildung beobachtet werden.

Der Vergleich mit der Ionenabhängigkeit der FgaDH-Reaktion zeigt, dass die relative Aktivität bei Zugabe von Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} und Co^{2+} bei beiden Reaktionen in etwa identisch ist und EDTA bei beiden zu einer Reduzierung der relativen Aktivität führte. Starke Unterschiede wurden bei Zugabe von Mn^{2+} und Ni^{2+} detektiert. Mn^{2+} reduziert die relative Aktivität bei ChaDH stärker, wohingegen Ni^{2+} die relative Aktivität bei FgaDH stärker reduziert. Fe^{2+} und Zn^{2+} wirken bereits bei der FgaDH-Reaktion stark inhibierend, während es bei der ChaDH-Reaktion sogar zum kompletten Verlust der Aktivität kommt. Die Auswirkung von Cu^{2+} wurde mit FgaDH nicht gemessen.

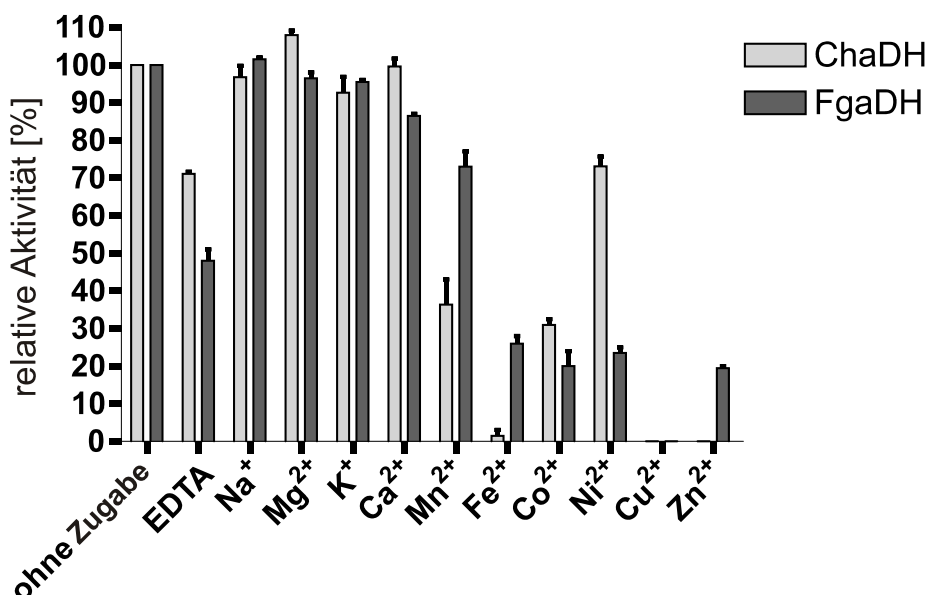


Abbildung 4-38: Graphische Darstellung der Ionenabhängigkeit der ChaDH-Reaktion im Vergleich zu der Ionenabhängigkeit der FgaDH-Reaktion.

4.3.2.5 Untersuchungen zu der von ChaDH bzw. FgaDH katalysierten Rückreaktion

Zu Beginn dieser Dissertation konnte die Reduktion von Chanoclavin-I-Aldehyd durch FgaDH-His₆ nicht beobachtet werden. Im Nachhinein stellte sich heraus, dass dies vermutlich an der Isolierung mittels HPLC und TFA-haltigen Lösungsmitteln lag, wodurch Chanoclavin-I-Aldehyd als TFA-Salz vorliegen könnte. Chanoclavin-I-Aldehyd konnte nur als Substrat eingesetzt werden, wenn es über Dünnschichtchromatographie aufgereinigt oder nach der Isolierung mittels HPLC

eine Deprotonierung durchgeführt worden ist.

Die Analyse der Reaktionsansätze mit isoliertem und deprotonierten Chanoclavin-I-Aldehyd als Substrat auf der analytischen Säule ergab, dass sowohl FgaDH-His₆ als auch ChaDH-His₆ die Rückreaktion katalysieren und Chanoclavin-I-Aldehyd bereits nach 4 h fast vollständig zu einem Produkt mit der gleichen Retentionszeit wie Chanoclavin-I umgesetzt wurde (Abbildung 4-39). Mit Hitze-inaktivierten Enzymen konnte keine Rückreaktion beobachtet werden. Als Positiv-Kontrolle wurde sowohl FgaDH-His₆ als auch ChaDH-His₆ mit Chanoclavin-I und NAD⁺ inkubiert. Der Peak bei $t_R > 30$ min, der in den HPLC-Chromatogrammen mit isoliertem Chanoclavin-I-Aldehyd auftaucht, liegt bereits in der Aldehyd-Probe vor und ist kein Produktpeak. Der Versuch, diesen Peak zu entfernen, indem das Chanoclavin-I-Aldehyd ein zweites Mal über HPLC aufgereinigt wurde, schlug fehl. Obwohl nur der Aldehyd-Peak aufgefangen wurde, war der Peak bei $t_R > 30$ min anschließend wieder vorhanden. Daraus lässt sich schließen, dass während der Isolierung oder der anschließenden Deprotonierung ein Teil des Aldehyds reagiert und für diesen Peak verantwortlich ist.

Um das Produkt isolieren zu können und als Chanoclavin-I zu identifizieren, wurde eine semipräparative Säule verwendet. Durch die bessere Trennleistung der Säule konnte ein zusätzlicher Peak zwischen Chanoclavin-I und Chanoclavin-I-Aldehyd detektiert werden (Abbildung 4-40). Die Ursache dieses Peaks konnte nicht identifiziert werden. Sowohl ohne Proteinzugabe als auch ohne Zugabe von NADH ist der Peak im HPLC-Chromatogramm vorhanden und entstand somit weder enzymatisch noch durch eine Reaktion mit dem Kofaktor. Anhand eines HPLC-Chromatogramms des isolierten Aldehyds, in dem der zusätzliche Peak nicht existierte, konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, dass der Peak durch eine Verunreinigung des isolierten Aldehyds hervorgerufen wird. Anhand eines Reaktionsansatzes ohne Inkubation bei 37 °C, d.h. direktes Abstoppen der Reaktion nach dem Ansetzen, zeigte sich, dass der zusätzliche Peak erst mit der Zeit entstand. Die Strukturaufklärung dieses zusätzlichen Peaks blieb erfolglos, da die Größe des Peaks nicht reproduzierbar war (Abbildung 4-40A und 4-40B) und nicht in ausreichender Menge für NMR-Analysen isoliert werden konnte. Eventuell wird der Peak durch das Produkt einer chemischen Reaktion mehrerer Aldehydmoleküle miteinander hervorgerufen, da bei einer Zunahme der Fläche des zusätzlichen Peaks die Fläche des Aldehyd-Peaks abnahm (Abbildung 4-40A und 4-40B). Die Peakfläche der Verunreinigungen bei $t_R > 32$ min blieb identisch. Die MS-Analyse eines Reaktionsansatzes führte jedoch zu keinem Ergebnis. Es konnten keine Ionen für mögliche Aldehyd-Oligomere entdeckt werden. Aufgrund des zusätzlichen Peaks konnte keine K_M -Wert Bestimmung für die Rückreaktion durchgeführt werden.

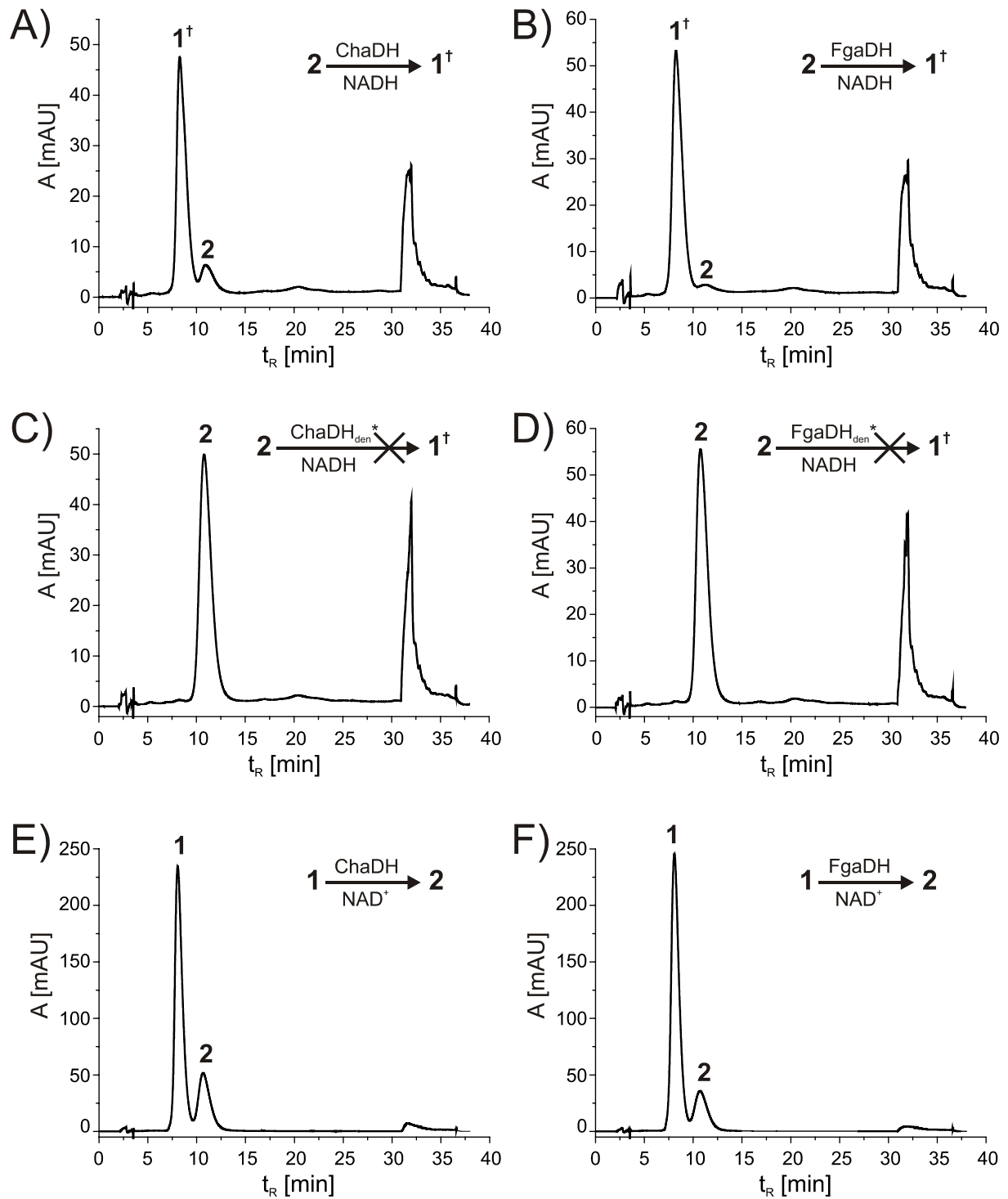


Abbildung 4-39: HPLC-Chromatogramme zu den Reaktionen mit isoliertem Chanoclavin-I-Aldehyd A) mit aktivem ChaDH-His₆, B) mit aktivem FgaDH-His₆, C) mit Hitze-inaktiviertem ChaDH-His₆ und D) mit Hitze-inaktiviertem FgaDH-His₆. Als Standards wurden Inkubationen mit Chanoclavin-I und E) aktivem ChaDH-His₆ bzw. F) aktivem FgaDH-His₆ durchgeführt. Die Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 296 nm aufgenommen. (1: Chanoclavin-I, 1[†]: Substanz mit gleicher t_R wie Chanoclavin-I, 2: Chanoclavin-I-Aldehyd, den*: das Protein wurde für 30 min bei 100 °C denaturiert)

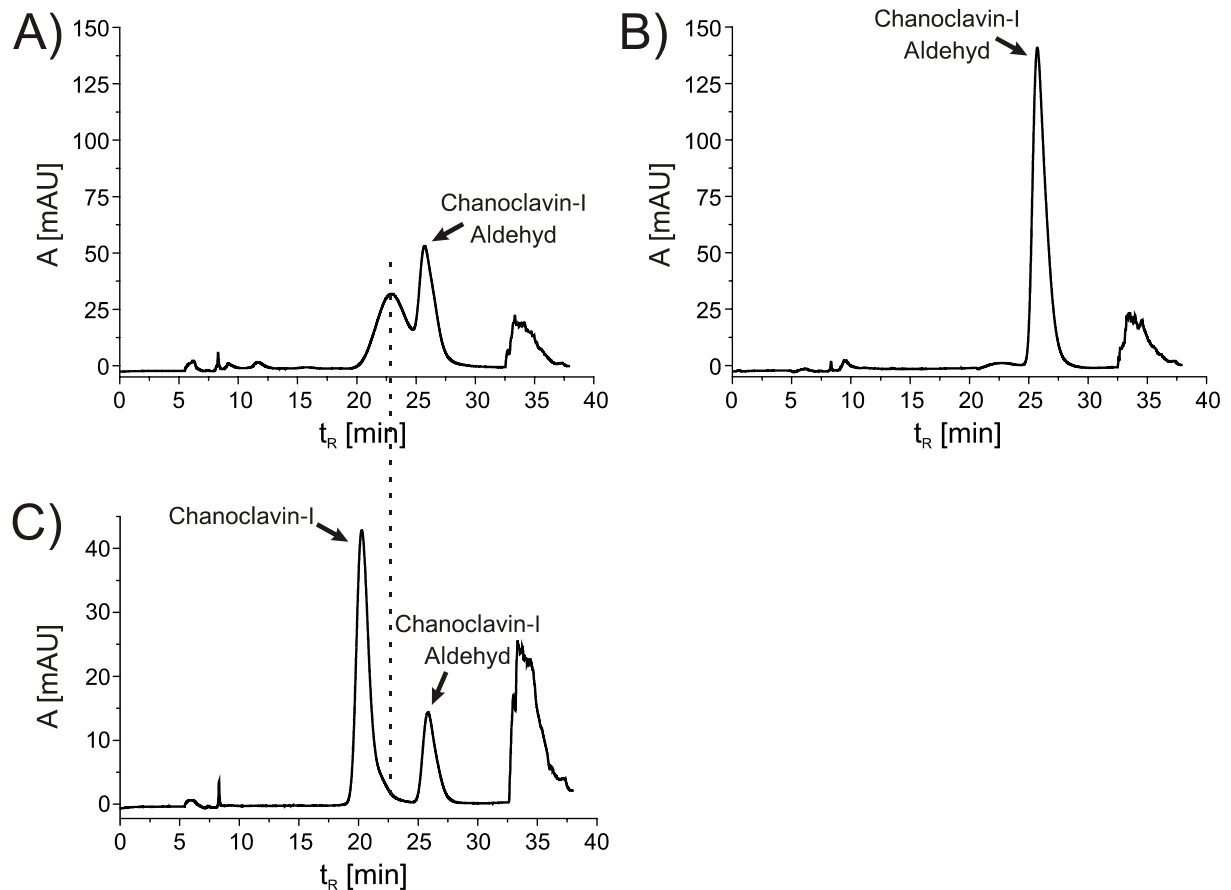


Abbildung 4-40: HPLC-Chromatogramme ausgesuchter Reaktionen mit isoliertem Chanoclavin-I-Aldehyd auf der semipräparativen Säule. A) mit 0 mM NADH, B) Wiederholung mit 0 mM NADH und C) Inkubation von Chanoclavin-I mit aktivem ChaDH-His₆ als Standard.

4.3.3 Untersuchung der Gene in Nachbarschaft zu den fünf homologen Genen aus *Arthroderma benhamiae*

4.3.3.1 Klonierung und Expression der Gene

Wie in Kapitel 4.3.1 erwähnt, besteht die Möglichkeit, dass eine Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd durch bisher nicht identifizierte Proteine zu einer anderen Substanz stattfindet. Die Gene, die eventuell in diese Umsetzung involviert sind, könnten in Nachbarschaft zu den fünf homologen Genen liegen. Daher wurden die Gene *ARB_04643*, *ARB_04644*, *ARB_04650*, *ARB_04651*, *ARB_04652* und *ARB_04653* für die Klonierung und Expression ausgewählt. Abbildung 4-41 zeigt das putative Ergotalkaloidgencluster mit den ausgewählten Genen. Prof. Brakhage aus Jena stellte dafür freundlicherweise gDNA des sequenzierten *A. benhamiae*-Stamms CBS 112371 zur Verfügung. Da das Gen *ARB_04643* aus 4 Exons besteht und vorerst nur gDNA zur Verfügung stand, wurden die Arbeiten an diesem Gen zunächst zurückgestellt.

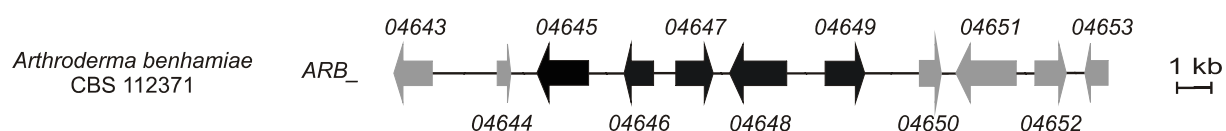


Abbildung 4-41: Das putative Ergotalkaloidgencluster in *A. benhamiae* mit den 5 homologen Genen (schwarze Pfeile) und den benachbarten Genen.

Die Gene *ARB_04644* und *ARB_04652* enthalten keine Introns und konnten daher direkt aus gDNA von *A. benhamiae* amplifiziert und in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy kloniert werden. Da bei beiden Genen fast identisch vorgegangen wurde, werden nur Agarosegele zu den Arbeiten mit *ARB_04644* gezeigt.

Für das Gen *ARB_04644* wurde eine Länge von 396 bp vorhergesagt. Nach der Amplifikation eines 415 bp langen Fragments aus der gDNA mit den Primern A.b.EFE37116_for und A.b.EFE37116_rev folgte die Ligation in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy (Abbildung 4-42). Das entstandene Klonierungskonstrukt pCW05 wurde für die Umklonierung des Gens mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BamHI* geschnitten. Der Expressionsvektor pQE-60 wurde mit den gleichen Enzymen geschnitten. Die Aufreinigung des 395 bp langen Inserts und des geschnittenen Expressionsvektors erfolgte durch Gelextraktion. Die anschließende Ligation von Insert und Vektor resultierte in dem Expressionskonstrukt pCW06 (Abbildung 4-42).

Das Gen *ARB_046452* wurde mit einer Länge von 915 bp vorhergesagt. Die Ligation des mit den Primern A.b.EFE37124_for und A.b.EFE37124_rev amplifizierten PCR-

Produkts mit einer Länge von 944 bp in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy resultierte in dem Klonierungskonstrukt pCW11. Die Umklonierung des 921 bp langen Inserts in den Expressionsvektor pHis8 erfolgte mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Hind*III, so dass das Expressionskonstrukt pCW12 entstand (Abbildung 4-43).

Das Gen *ARB_04653* enthält ebenfalls kein Intron, jedoch gelang es auch nach mehreren Versuchen nicht, das Gen zu amplifizieren.

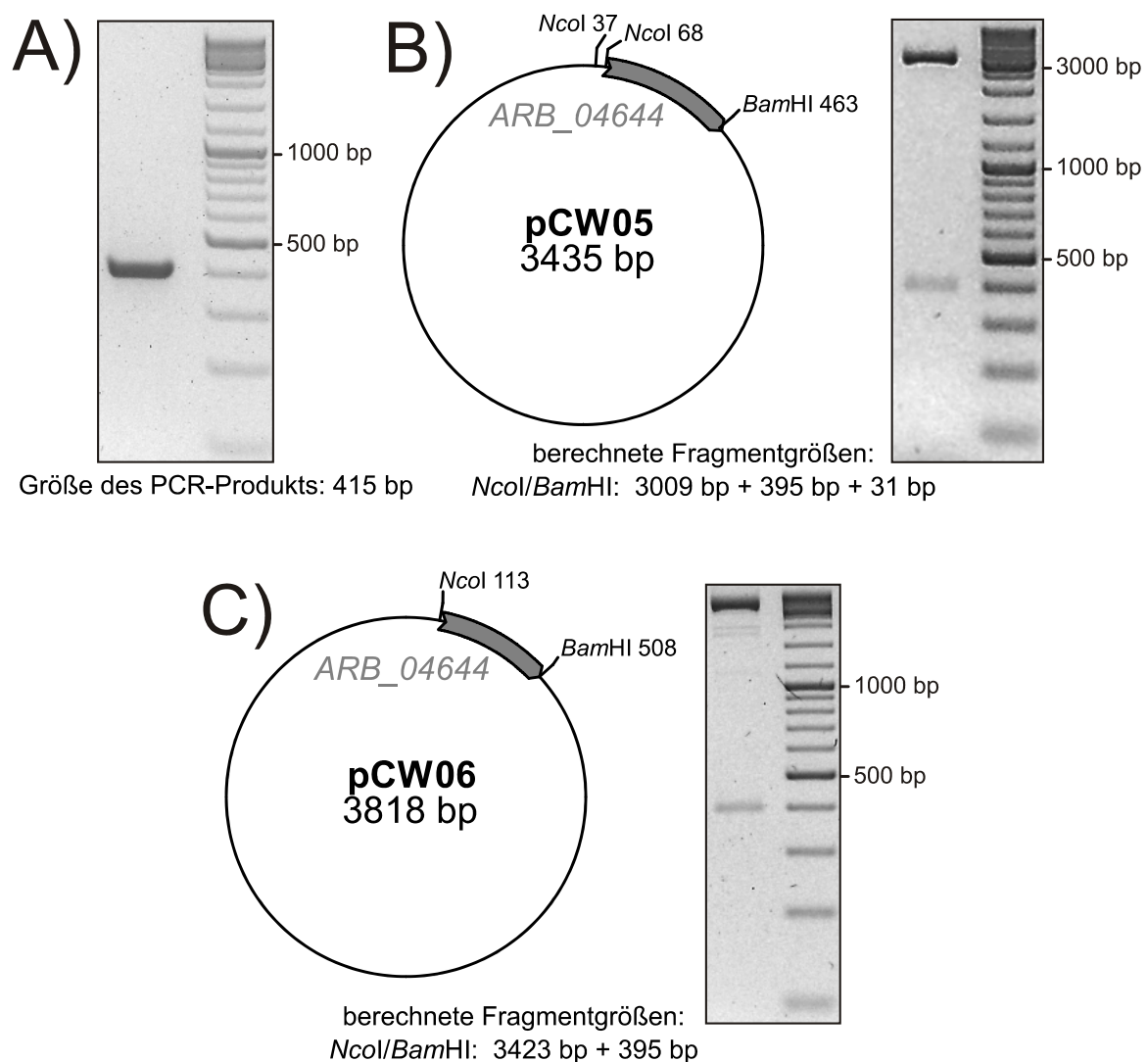


Abbildung 4-42: A) Agarosegel zur Amplifikation von *ARB_04644* aus gDNA von *A. benhamiae*. B) Das Klonierungskonstrukt pCW05 (*ARB_04644* in pGEM-T Easy) und C) das Expressionskonstrukt pCW06 (*ARB_04644* in pQE-60) mit den zur Umklonierung verwendeten Schnittstellen sowie die Agarosegele zu den Restriktionen der Plasmide mit diesen Restriktionsenzymen. Zusätzlich sind die zu erwartenden Fragmentgrößen nach der Restriktion aufgeführt.

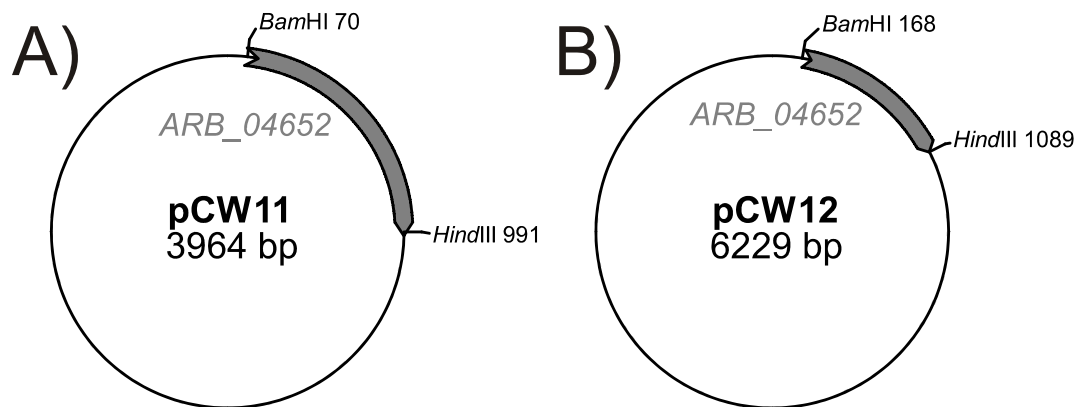


Abbildung 4-43: A) Das Klonierungskonstrukt pCW11 (*ARB_04652* in pGEM-T Easy) und B) das Expressionskonstrukt pCW12 (*ARB_04652* in pHis8) mit den zur Umklonierung verwendeten Schnittstellen.

Für das Gen *ARB_04650* wurden zwei Exons mit einer Länge von 297 bzw. 219 bp vorausgesagt. Das Intron dazwischen hat eine Länge von 86 bp. Da die Amplifikation aus gDNA erfolgte, musste das Intron mittels Fusions-PCR eliminiert werden. Dazu wurden in der ersten Runde zwei Fragmente mit einer Länge von 329 und 251 bp, die jeweils die Sequenz eines Exons enthielten, separat mit den Primern A.b.EFE37122_for und A.b.EFE37122_P2 bzw. A.b.EFE37122_P3 und A.b.EFE37122_rev amplifiziert. In der zweiten Runde wurden die beiden Fragmente unter Zugabe der Primer A.b.EFE37122_for und A.b.EFE37122_rev zu einem 530 bp langen Produkt fusioniert (Abbildung 4-44). Die Aufreinigung des Fusionsprodukts erfolgte mittels Gelextraktion. Die anschließende Ligation mit dem Klonierungsvektor pGEM-T Easy resultierte in dem Klonierungskonstrukt pCW07. Die Umklonierung des 515 bp langen *Nco*I-*Bam*HI-Fragments in den Expressionsvektor pQE-60 ergab das Expressionskonstrukt pCW08.

Das Gen *ARB_04651* wurde in zwei Varianten kloniert. Einmal in der bei NCBI hinterlegten Länge mit zwei Exons und einem Intron und einmal als verkürzte Variante mit einem Startcodon, das im zweiten von NCBI hervorgesagten Exon liegt. Das NCBI-Gen codiert für ein Protein mit einer Länge von 522 AS, das verkürzte Gen mit nur einem Exon für ein Protein mit 425 AS. Die unterschiedlichen Sequenzlängen wurden ausgewählt, da das homologe Protein aus *A. otae* eine Größe von 517 AS aufweist, während das Homolog aus *T. verrucosum* eine Größe von 426 AS besitzt. Bei der längeren Gensequenz von *ARB_04651* befand sich ein Intron mit einer Länge von 192 bp zwischen den beiden Exons mit einer Länge von 1422 bzw. 147 bp. Das Intron musste durch Fusions-PCR eliminiert werden. Dazu wurde mit den Primern A.b.EFE37123_P1 und A.b.EFE37123_P2 ein 170 bp langes Fragment und mit den Primern A.b.EFE37123_P3 und A.b.EFE37123_rev ein 1453 bp langes Fragment amplifiziert. Die beiden Fragmente enthalten jeweils die Gensequenz von

einem der zwei vorhergesagten Exons. Die kürzere Sequenz ohne Intron konnte direkt mit den Primern A.b.EFE37123_for und A.b.EFE37123_rev aus der gDNA amplifiziert werden (Abbildung 4-45). Die Ligation des Klonierungsvektors pGEM-T Easy mit dem 1297 bp langen PCR-Produkt, das die verkürzte Gensequenz für *ARB_04651* enthielt, resultierte in dem Klonierungskonstrukt pCW09. Die Ligation des 1588 bp langen Fusionsprodukts der Gensequenz für *ARB_04651*, bei der zuvor durch Fusions-PCR das Intron eliminiert wurde, resultierte in dem Klonierungskonstrukt pCW13 (Abbildung 4-46).

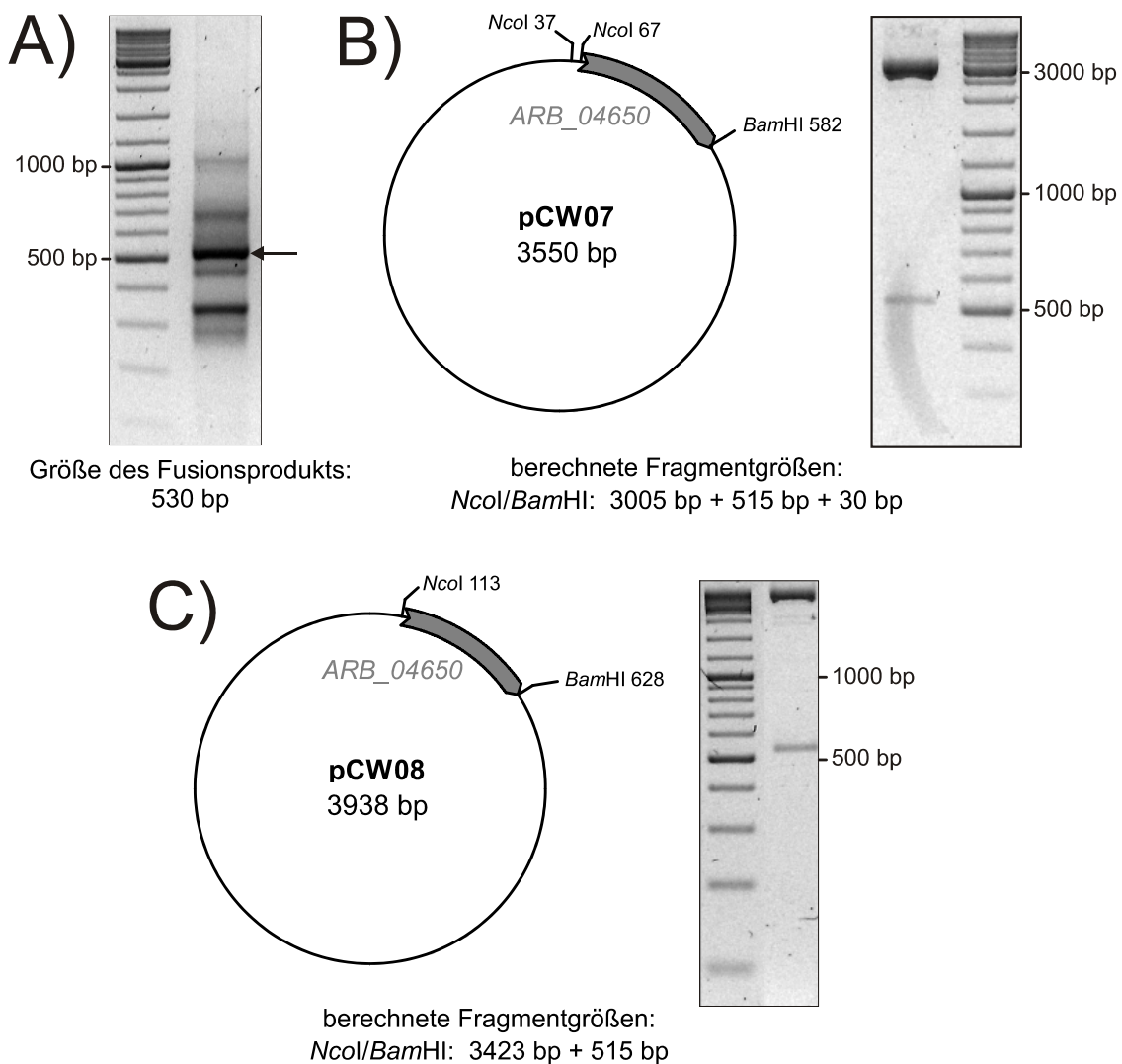


Abbildung 4-44: A) Agarosegel zur zweiten Runde der Fusions-PCR für *ARB_04650*. B) Das Klonierungskonstrukt pCW07 (*ARB_04650* in pGEM-T Easy) und C) das Expressionskonstrukt pCW08 (*ARB_04650* in pQE-60) mit den zur Umklonierung verwendeten Schnittstellen sowie die Agarosegele zu den Restriktionen der Plasmide mit diesen Restriktionsenzymen. Zusätzlich sind die zu erwartenden Fragmentgrößen nach der Restriktion aufgeführt.

Bei beiden Sequenzen von *ARB_04651* musste die Umklonierung in den Expressionsvektor pQE-60 aufgrund einer zusätzlichen *BamHI* Schnittstelle in dem

Insert mit Hilfe einer partiellen Restriktion durchgeführt werden. Dazu wurden die Klonierungskonstrukte zuerst komplett mit *Nco*I und anschließend partiell für 30 sek mit *Bam*HI geschnitten. Die Auftrennung der unterschiedlichen Fragmente erfolgte gelelektrophoretisch. Das Fragment mit der korrekten Länge von 1277 bp bzw. 1568 bp, d.h. wenn *Bam*HI nur am Ende des Inserts geschnitten hat, wurde für die Ligation in den Expressionsvektor pQE-60 über Gelextraktion aufgereinigt. Die Abbildung 4-45 zeigt u.a. das Agarosegel zu der partiellen Restriktion des verkürzten Gens *ARB_04651*. Das Expressionskonstrukt mit der verkürzten Gensequenz für *ARB_04651* wurde als pCW10 bezeichnet, das mit der Gensequenz nach NCBI als pCW14.

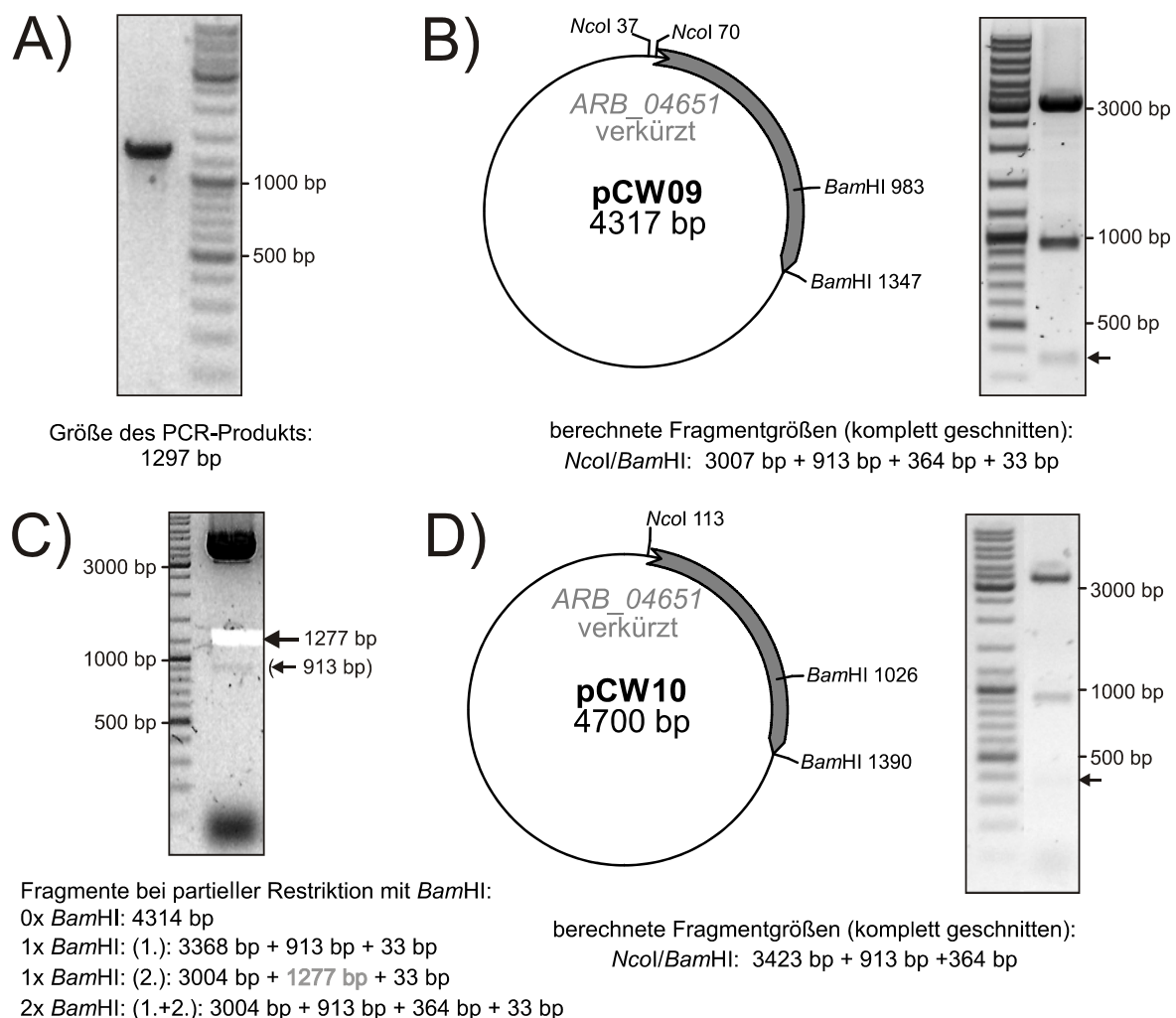


Abbildung 4-45: A) Agarosegel zur Amplifikation des Gens *ARB_04651* mit verkürzter Sequenz. B) Das Klonierungskonstrukt pCW09 (*ARB_04651* verkürzt in pGEM-T Easy) mit den zur Umklonierung verwendeten Schnittstellen sowie das Agarosegel zu der Restriktion von pCW09 mit diesen Restriktionsenzymen. C) Das Agarosegel der partiellen Restriktion (die Bande mit dem 1277 bp-Fragment wurde bereits ausgeschnitten). D) Das Expressionskonstrukt pCW10 (*ARB_04651* verkürzt in pQE-60) mit den zur Umklonierung verwendeten Schnittstellen sowie das Agarosegel zu der Restriktion von pCW10 mit diesen Restriktionsenzymen. Die zu erwartenden Fragmentgrößen nach den Restriktionen sind aufgeführt.

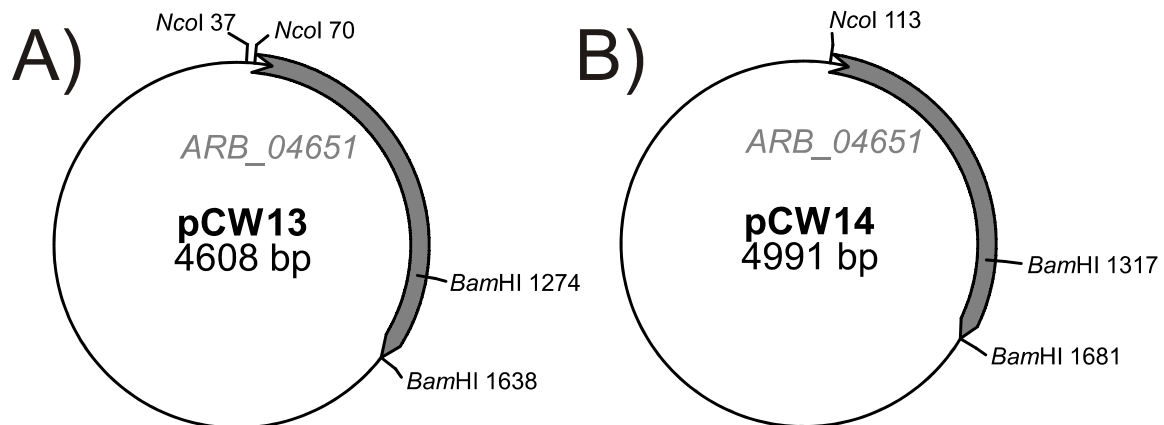


Abbildung 4-46: A) Das Klonierungskonstrukt pCW13 (*ARB_04651* in pGEM-T Easy) und B) das Expressionskonstrukt pCW14 (*ARB_04651* in pQE-60) mit den zur Umklonierung verwendeten Schnittstellen.

Die mit dem Primer A.b.EFE37123_P1 für die Umklonierung eingefügte *NcoI*-Schnittstelle führte bei dem Konstrukt pCW14 dazu, dass die erste Base hinter dem ATG von A zu G mutiert wurde. Dadurch wurde in der Aminosäuresequenz die Aminosäure Threonin hinter dem Start-Methionin zu Alanin mutiert. Bei den anderen Konstrukten wurden durch die am 5'-Ende eingefügten Schnittstellen keine Mutationen verursacht. Bevor die Umklonierung in den jeweiligen Expressionsvektor stattfand, wurden die Sequenzen aller Klonierungskonstrukte durch die Sequenzierung bestätigt.

4.3.3.2 Expressionsversuche

Die Expressionsversuche im 100 ml Maßstab (Tabelle 4-11) nach erfolgreicher Hitzeschock-Transformation der *E. coli* Zellen führten nur bei *ARB_04644* zu detektierbarem, aufgereinigtem Protein. Bei fast allen anderen Genen konnte keine Überexpression detektiert werden und nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose wurde auch kein Protein erhalten. Bei den Expressionsversuchen mit *ARB_04652* kam es zu der Bildung von Einschlusskörperchen, die auch unter Verwendung von *soluBL21* Zellen nicht verhindert werden konnten.

Das von dem Gen *ARB_04644* codierte Protein EFE37116 besitzt ein theoretisches Molekulargewicht inkl. *His₆-tag* von 15,96 kDa. Sowohl mit LB- als auch mit TB-Medium konnte ein Protein aufgereinigt werden, dessen Größe zwischen 14 und 20 kDa lag (Abbildung 4-47). Das aufgereinigte Protein wurde für Aktivitätstests verwendet.

Tabelle 4-11: Die getesteten Bedingungen für die Expression der verschiedenen Gene.

Plasmid/Gen	Zellen	Medium	OD ₆₀₀ bei Induktion	IPTG-Endkonz.	Temperatur und Dauer	Ergebnis
pCW06/ARB_04644	XL1-Blue MRF'	TB	0,6	0,5 mM	37 °C, 4 h	Aufgereinigtes Protein
		LB	0,6	0,5 mM	37 °C, 4 h	Aufgereinigtes Protein
pCW08/ARB_04650	XL1-Blue MRF'	TB	0,6	0,5 mM	37 °C, 4 h	Keine Überexpression
		LB	0,6	0,5 mM	37 °C, 4 h	Keine Überexpression
pCW08/ARB_04650	M15	TB	0,6	0,5 mM	37 °C, 5 h	Keine Überexpression
		LB	0,6	0,5 mM	37 °C, 5 h	Keine Überexpression
		TB	0,6	0,5 mM	22 °C, 16 h	Keine Überexpression
		LB	0,6	0,5 mM	22 °C, 16 h	Keine Überexpression
pCW10/ ARB_04651 (verkürzt)	XL1-Blue MRF'	TB	0,6	0,5 mM	37 °C, 16 h	Keine Überexpression
pCW14/ARB_04651	XL1-Blue MRF'	TB	0,6	0,5 mM	37 °C, 16 h	Keine Überexpression
pCW12/ARB_04652	BL21	TB	0,6	0,5 mM	37 °C, 16 h	Einschlußkörperchen
pCW12/ARB_04652	soluBL21	TB	0,4	0,2 mM	22 °C, 16 h	Einschlußkörperchen
		LB	0,4	0,2 mM	22 °C, 16 h	Einschlußkörperchen

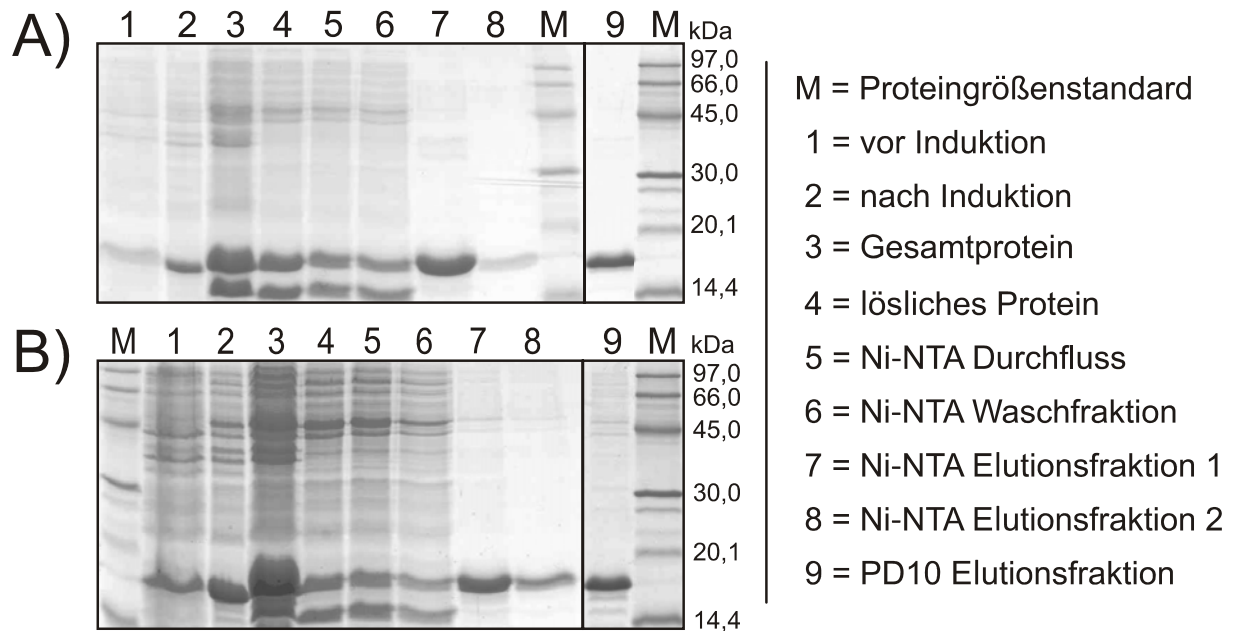


Abbildung 4-47: SDS-PAGE der Aufreinigung von His₆-EFE37116. A) LB-Medium und B) TB-Medium. Es wurde ein 17 % Trenngel verwendet.

4.3.3.3 Aktivitätstests mit dem aufgereinigten Protein EFE37116

Es wurden zwei verschiedene Strategien verwendet. Bei der ersten wurde zu Beginn ein 20 ml Reaktionsansatz mit FgaDH-His₆ aus *A. fumigatus* zur Gewinnung von Chanoclavin-I-Aldehyd aus Chanoclavin-I angesetzt. Das erhaltene Gemisch aus Chanoclavin-I und Chanoclavin-I-Aldehyd wurde dann als Substrat für das Protein EFE37116 verwendet. Bei der zweiten Strategie diente Chanoclavin-I als Substrat, während eine Koinkubation von EFE37116 und FgaDH aus *A. fumigatus* mit NAD⁺ durchgeführt wurde. Eine Koinkubation mit FgaDH führte bereits bei FgaOx3 und FgaFS (Kapitel 4.1.2 und 4.1.3) zu einer erhöhten Produktausbeute. Die Menge an eingesetztem EFE37116 betrug jeweils 10 µg.

Das Protein EFE37116 zeigte keine Homologie zu bekannten Proteinen. Daher wurde für die Auswahl der möglichen Kofaktoren die Struktur von Chanoclavin-I-Aldehyd, das vermeintliche Substrat von EFE37116, mit ergotalkaloidähnlichen Substanzen (Kapitel 1.2.4) verglichen, die die Ringe A bis C aber keinen Ring D besitzen. Vergleicht man z.B. Rugulovasine mit Chanoclavin-I-Aldehyd, fällt auf, dass der Unterschied in den Strukturen ein Ringschluss unter Einbau eines Sauerstoff-Atoms ist. Zuvor muss eine Isomerisierung stattfinden (Abbildung 4-48). Chemisch handelt es sich damit um eine Oxidation. Daher wurden verschiedene oxidative Kofaktoren wie NAD⁺, NADP⁺, FAD, FMN, α -Ketoglutarat und Fe(II)sulfat getestet. Soweit erforderlich wurde Ascorbat als Fe(III)-reduzierendes Reagenz zugegeben.

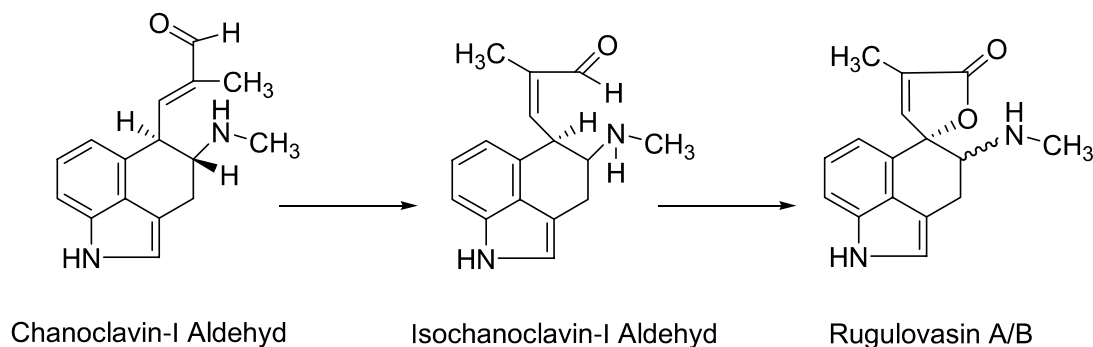


Abbildung 4-48: Hypothetische Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Rugulovasin.

Weiterhin wurden Kombinationen mit Zugabe von 135 units (13 µg) Catalase aus *Aspergillus niger* getestet, da die Gene, die Homologien zu Catalasen aufweisen, d.h. *fgaCat* und *easC*, zu diesem Zeitpunkt weder in *A. fumigatus* noch in *C. purpurea* einem Reaktionsschritt in der Biosynthese zugeordnet werden konnten. Bei keinem der Reaktionsansätze konnte in den HPLC-Chromatogrammen ein zusätzlicher Peak detektiert werden, der auf ein Produkt hinweisen würde. Da die Tests mit aufgereinigtem Protein ohne Erfolg blieben, wurde statt der aufgereinigten Proteinfraction von EFE37116 die lösliche Proteinfraction verwendet, die eventuell den(die) benötigten Kofaktor(en) enthält. Auch unter diesen Bedingungen konnte kein Produkt detektiert werden.

Die in dieser Dissertation durchgeführten Klonierungs- und Expressionsarbeiten zu den Genen *ARB_04644*, *ARB_04650*, *ARB_04651* und *ARB_04652* sollen die Grundlage für weitere Arbeiten liefern, zu denen u. a. die Optimierung der Expressionsbedingungen zählt.

4.3.3.4 Analyse der Kulturüberstände von *Arthroderma benhamiae*

Um zu überprüfen, ob *A. benhamiae* tatsächlich Chanoclavin-I Aldehyd oder beispielsweise Rugulovasin produziert, erfolgte eine Analyse der Kulturüberstände. Der Pilz wurde freundlicherweise von Christoph Heddergott unter verschiedenen Bedingungen kultiviert (Material und Methoden, Kapitel 3.6.1). Nach der Abtrennung des Mycels für die RNA-Isolierung, erfolgte in eigener Arbeit die Extraktion der Kulturüberstände mit Ethylacetat in Jena. Als Kontrollen dienten Medien, die nicht mit dem Pilz inokuliert wurden. Die Extraktion wurde sowohl direkt als auch noch einmal nach der Einstellung des pH-Werts des Überstands bzw. Mediums auf 9 durchgeführt. Nach dem Einengen der Extrakte folgte die Analyse mittels HPLC und DC. Die DC-Platten wurden mit van Urk-Reagenz besprüht, das üblicherweise für die Detektion von Ergotalkaloiden verwendet wird. Weder die Analyse der Extrakte mittels DC noch die anschließende Analyse mittels HPLC zeigten detektierbare Mengen an Chanoclavin-I-Aldehyd oder anderen Ergotalkaloiden.

4.3.3.5 Expressionsanalyse der 5 homologen Gene des putativen Ergotalkaloidgenclusters mittels Northern Blotting

Da kein Chanoclavin-I-Aldehyd oder andere Ergotalkaloide in den Kulturüberständen nachgewiesen werden konnten, wurde die Expression der 5 homologen Gene im putativen Ergotalkaloidgencluster überprüft. Die Isolierung der RNA aus dem Mycel von *A. benhamiae* und die anschließende Analyse der Expression mittels Northern Blotting erfolgte durch Christoph Heddergott. Der Northern Blot wird hier der Vollständigkeit halber abgebildet (Abbildung 4-49).

Die Analyse der isolierten RNA durch Gelelektrophorese bestätigt die Menge und die Qualität der für das Northern Blotting verwendeten RNA (Abbildung 4-49A). Die Signale der Positiv-Kontrollen, die konstitutiv exprimierten Aktin und Hydrophobin Gene, waren bereits nach 5 min Entwicklungszeit eindeutig bei allen 5 verwendeten Kultivierungsbedingungen zu erkennen (Abbildung 4-49B und Abbildung 4-49C). Im Vergleich dazu konnte nach dieser Zeit bei keiner der Bedingungen ein Signal bei den 5 homologen Genen detektiert werden. Erst nach einer Verlängerung der Entwicklungszeit auf 60 min konnten sehr schwache Signale beobachtet werden (Abbildung 4-49D bis 4-49H). Aufgrund der Degradierung der RNA, die beobachtet wurde, wenn RNA aus älterem Mycel (z.B. nach 96 Stunden Kultivierung) isoliert wurde, war es nicht möglich, die Expression der Gene zu einem späteren Kultivierungszeitpunkt zu untersuchen.

Die Ergebnisse der RT-PCR für *chaDH* (*ARB_04646*) mit genspezifischen Primern, die für die Kontrolle der Intron/Exon-Struktur von Christoph Heddergott durchgeführt wurde, bestätigte die geringe Menge an RNA von *chaDH*. Die Menge an amplifizierter DNA war trotz niedriger Anlagerungstemperatur und 40 PCR-Zyklen sehr gering.

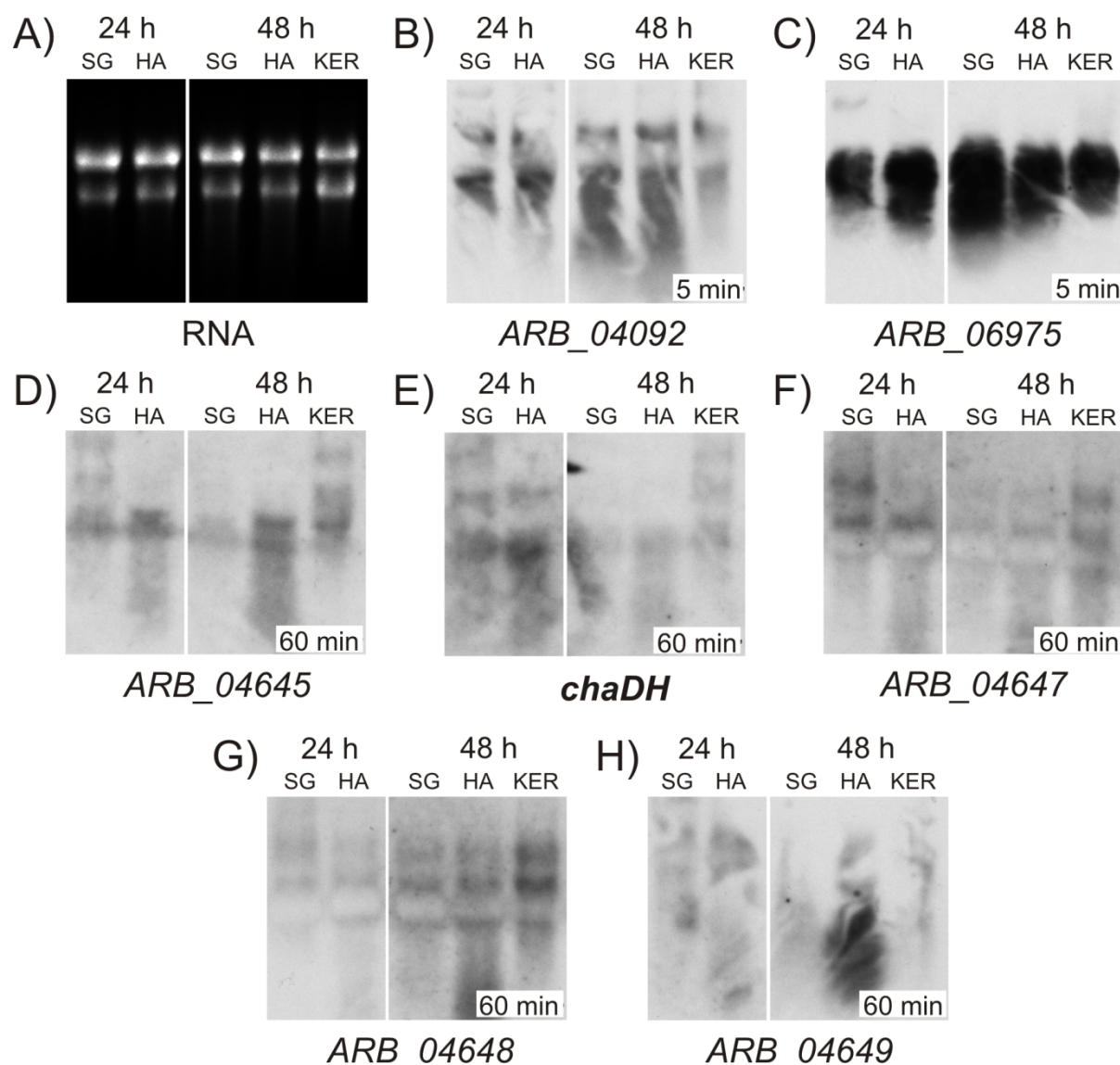


Abbildung 4-49: Northern Blot-Analyse des mRNA *steady-state* Levels der 5 homologen Genen (*ARB_04645* – *ARB_04649*) aus dem putativen Ergotalkaloidgencluster. A) mRNA, 1,2 % Agarosegel, visualisiert mit Ethidiumbromid, B) und C) Northern Blot-Signale der Kontrollgene *ARB_04092* und *ARB_06975* nach 5 min Entwicklungsdauer, D) bis H) Northern Blot-Signale für die 5 homologen Gene nach 60 min Entwicklungsdauer. (SG: Sabouraud Glukose Medium, HA: Keratinozyten Kokultivierung, KER: Keratin Medium)

5 Diskussion

5.1 Die Biosynthese von Ergotalkaloiden in *Aspergillus fumigatus*

5.1.1 Die Chanoclavin-I-Dehydrogenase FgaDH

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass FgaDH die Umsetzung von Chanoclavin-I zu Chanoclavin-I-Aldehyd katalysiert und daher als Chanoclavin-I-Dehydrogenase fungiert. Die Reaktion ist dabei strikt von der Anwesenheit von NAD^+ abhängig. Das Enzym FgaDH enthält die beiden Motive TGXXX[AG]XG und YXXXK der klassischen SDRs, zeigt aber ansonsten keine Sequenzähnlichkeit zu bekannten SDRs oder anderen bekannten Proteinen in der Datenbank. Daher scheint FgaDH eine neue Gruppe innerhalb der klassischen SDRs zu repräsentieren.

Es wird angenommen, dass die Homologen von FgaDH in anderen Pilzen, wie z.B. in *P. commune* oder *C. purpurea* (Schardl *et al.*, 2006), die gleiche Reaktion katalysieren wie FgaDH in *A. fumigatus*. Dafür spricht auch die direkte Umsetzung von Chanoclavin-I zu Agroclavin durch den Rohextrakt von *C. purpurea* Pla-4 bzw. *C. paspali* MG-6 (Sajdl & Reháček 1975). Diese Umsetzung ist nach den aktuellen Erkenntnissen wahrscheinlich das Endergebnis mehrerer Reaktionen gewesen, die von verschiedenen Enzymen, inklusive einem Homolog von FgaDH, katalysiert werden.

In vitro konnte mit FgaDH ein maximaler Umsatz von nur knapp 30 % erreicht werden. Sobald FgaOx3 und FgaFS mit FgaDH koinkubiert wurden, fand eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts der FgaDH-Reaktion in Richtung des Produkts statt und eine fast vollständige Umsetzung von Chanoclavin-I zu Festuclavin war möglich. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass eine signifikante Rückreaktion von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Chanoclavin-I in Anwesenheit von NADH und Abwesenheit der im Biosyntheseweg folgenden Enzyme stattfindet. Sobald die Enzyme, die die Reaktion von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin katalysieren, vorhanden sind, liegt kein Chanoclavin-I-Aldehyd mehr als Substrat für die Rückreaktion vor. Durch die Zugabe eines NADH-verbrauchenden Enzyms und seines Substrats könnte versucht werden, die Rückreaktion durch die Entfernung des NADH zu verhindern/verringern und die Ausbeute an Chanoclavin-I-Aldehyd so zu steigern. Weiterhin besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass bei der FgaDH-Reaktion eine Produkthemmung vorliegt. Durch die weitere Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin liegt dann kein Chanoclavin-I-Aldehyd mehr vor, das die FgaDH-Reaktion inhibieren kann. In diesem Fall würde die Zugabe eines NADH-verbrauchenden Enzyms keine Auswirkung auf den Umsatz haben.

5.1.2 Die durch FgaOx3 und FgaFS katalysierte Bildung von Festuclavin

In dieser Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Bildung von Festuclavin aus Chanoclavin-I-Aldehyd durch zwei Enzyme, FgaOx3 und FgaFS, katalysiert wird. In Abwesenheit von FgaFS, werden durch FgaOx3 die zwei Isomere **3a** und **3b** gebildet, die nicht als Substrat für FgaFS dienen. Die Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu **3a** und **3b** muss sowohl eine Reduktion der Doppelbindung zwischen C-8 und C-9, die Bildung einer C-N Bindung zwischen C-7 und N-6, als auch eine Öffnung der C-C Bindung zwischen C-7 und C-8 und den Einbau eines Sauerstoffatoms als Carbonylgruppe an C-8 beinhalten. Es scheint, als würden all diese Schritte von einem einzigen Enzym, FgaOx3, katalysiert.

Da für die Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin die beiden Enzyme FgaOx3 und FgaFS gemeinsam vorliegen müssen, scheint für die Umwandlung des Substrats eine Interaktion von FgaOx3 und FgaFS vorzuliegen. Das Isomergemisch könnte daher ein artifizielles Zwischenprodukt sein, das nur *in vitro*, nicht aber *in vivo* vorkommt, da in *A. fumigatus* beide Proteine vorhanden sind und somit interagieren können.

5.1.2.1 Hypothetischer Reaktionsmechanismus zur Bildung von Festuclavin aus Chanoclavin-I-Aldehyd

Anhand der Ergebnisse aus dieser Arbeit wurde ein Mechanismus für die Bildung von Festuclavin aus Chanoclavin-I-Aldehyd postuliert (Abbildung 5-1). Der putative Mechanismus beginnt mit der Bildung des Intermediats (**5**) durch die Reduktion der Doppelbindung zwischen C-8 und C-9 des Chanoclavin-I-Aldehyds (**2**) in der Gegenwart von NADH durch FgaOx3. Durch die Reduktion ist eine Rotation um diese Bindung möglich und nach der Isomerisierung wird durch eine spontan ablaufende Zyklisierung das Iminium-Ion (**3c**) mit einer molekularen Masse von 239 g/mol gebildet. Bereits 1978 konnte durch Fütterungsexperimente mit Isotopenmarkierten Vorläufermolekülen gezeigt werden, dass vor der Bildung von Ring D eine Isomerisierung stattfinden muss (Plieninger *et al.*, 1978). Ein M^+ Ion bei $m/z = 239$ konnte in dem positiven ESI Spektrum des isolierten Produktpeaks der FgaOx3-Reaktion detektiert werden (Abbildung 7-5 im Anhang), jedoch nicht in den NMR-Spektren. Das weist daraufhin, dass der isolierte Peak in kleinen Mengen das vorgeschlagene Imminium-Intermediat enthält, die Isomere **3a** und **3b** aber den Hauptanteil einnehmen.

Die Zugabe von FMN zu FgaOx3 ist notwendig, um das Enzym von seiner Apo- in die Holo-Form zu überführen. Normalerweise enthalten die Old Yellow-Enzyme

FMN, als nicht-kovalent gebundene, prosthetische Gruppe und besitzen eine gelbliche Farbe, wodurch der Name zustande kommt. Dies war bei FgaOx3 nicht der Fall. Es zeigte sich weder eine Gelbfärbung der aufgereinigten Proteinlösung, noch konnte Enzymaktivität ohne Zugabe von FMN zu den Reaktionsansätzen nachgewiesen werden. Eventuell hatte das Enzym zu Beginn FMN gebunden und die prosthetische Gruppe ging während der Aufreinigung verloren. Die Zugabe von FMN zum Reaktionsansatz führte jedoch wieder zu einer erfolgreichen Aktivierung des Enzyms. Die Experimente zeigten, dass es möglich war FMN durch FAD zu ersetzen. Allerdings war die Enzymaktivität mit FAD geringer.

Die Reduktion von **3c** durch FgaFS resultiert in der Bildung von Festuclavin (**4**). Die Bildung von **5** ist vermutlich eine stereochemisch unspezifische Reaktion. Dadurch kann bei der Zyklisierung zu **3c** sowohl das Isomer mit einer β - als auch das mit einer α -Methylgruppe an C-8 entstehen. FgaFS von *A. fumigatus* akzeptiert jedoch überwiegend **3c** mit einer β -Methylgruppe an C-8 und nur kleine Mengen des Stereoisomers mit einer α -Methylgruppe. Das Gleichgewicht zwischen **3c** und seinem Tautomer (**6**) sorgt dafür, dass ständig aus dem nicht durch FgaFS akzeptierten **3c** mit einer α -Methylgruppe wieder ein Teil **3c** mit einer β -Methylgruppe gebildet wird. Dieses wird dann wieder durch die weiter Umsetzung zu Festuclavin aus dem Gleichgewicht entfernt. Dadurch wird Festuclavin als das Hauptenzymprodukt gebildet. Sollte die Reduktion von Chanoclavin-I-Aldehyd zu **5** doch stereospezifisch ablaufen, können durch die Isomerisierung von **3c** zu **6** und zurück zu **3c** trotzdem wieder Moleküle mit α -Methylgruppe und β -Methylgruppe entstehen. Matuschek *et al.* konnten 2012 zeigen, dass die Stereochemie des Produkts erst durch die Iminreduktase bestimmt wird (Matuschek *et al.*, 2012). In der Abwesenheit von FgaFS wird das Intermediat **6** durch FgaOx3 zu einem Gemisch aus **3a** und **3b** oxidiert. Weder **3a** noch **3b** wird von FgaFS als Substrat akzeptiert. Dieser Reaktionsmechanismus würde auch erklären, dass der kleine Peak vor Festuclavin als Gemisch aus **3a**, **3b** und Pyroclavin identifiziert wurde (Matuschek *et al.*, 2012).

Weiterhin kann spekuliert werden, dass **3c** *in vivo* möglicherweise direkt von FgaOx3 durch Substrat Channeling an FgaFS weitergeleitet wird (Huang *et al.*, 2001), wodurch keine Bildung von **3a** und **3b** stattfinden kann. Bisher gibt es keine Literatur dazu, dass diese Isomere in *A. fumigatus* gefunden wurden. Allerdings konnte mittels Größenausschlusschromatographie keine Interaktion von FgaOx3 und FgaFS nach der Inkubation mit oder ohne Chanoclavin-I-Aldehyd und den Kofaktoren beobachtet werden.

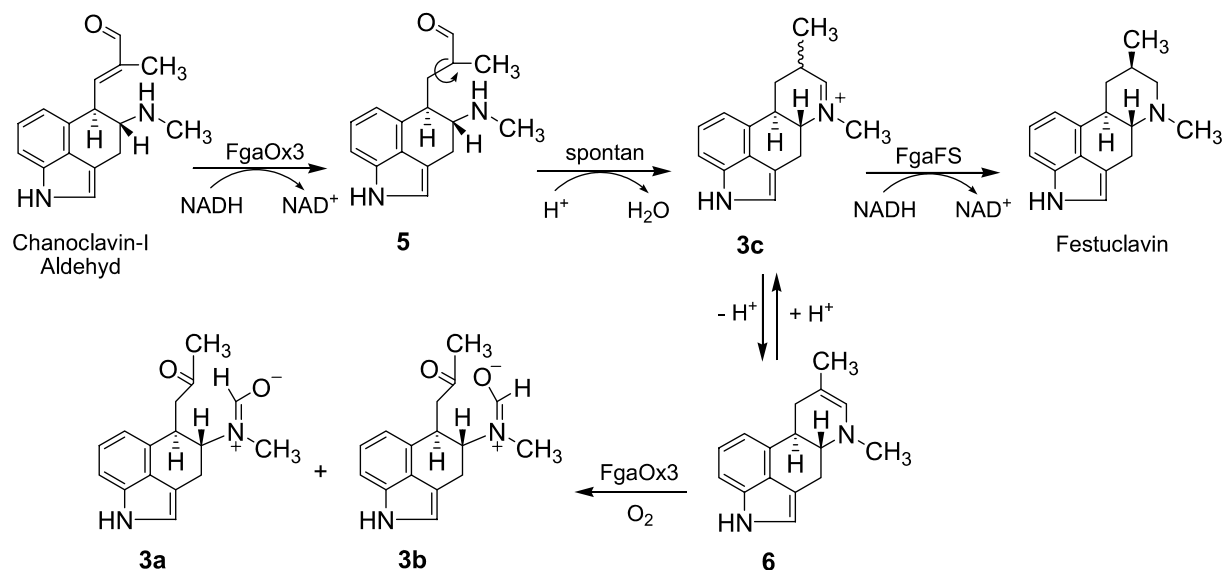


Abbildung 5-1: Hypothetischer Mechanismus für die Bildung von Festuclavin bzw. 3a und 3b aus Chanoclavin-I-Aldehyd.

Parallel zu dieser Arbeit wurde von Cheng *et al.* (2010a) eine Arbeit über das Old Yellow Enzyme EasA von *A. fumigatus* (entspricht in dieser Dissertation der Bezeichnung FgaOx3) veröffentlicht. In deren Arbeit wird gezeigt, dass die Inkubation von Chanoclavin-I-Aldehyd mit EasA in einem Imminium-Intermediat mit einer Molekularen Masse von 239 g/mol und der chemischen Formel C₁₆H₁₉N₂ resultiert (Cheng *et al.*, 2010a). Anhand der Darstellung der Ergebnisse ist nicht nachvollziehbar, ob die Isomere **3a** und **3b** ebenfalls detektiert wurden. Gezeigt wurde von dem Rohextrakt von *A. fumigatus* ein Total-Ionen LC-MS Chromatogramm, während von den Reaktionsansätzen mit EasA nur LC-MS Chromatogramme für ein jeweils ausgewähltes Ionen dargestellt wurden. Mehrere Tatsachen weisen aber darauf hin, dass die Isomere gebildet wurden. Wahrscheinlich entstanden, wie in dieser Dissertation auch, überwiegend die Isomere und nur in kleinen Mengen das Imminium-Ion. Zum Einen wurde das Imminium-Intermediat nicht für NMR-Analysen isoliert und ein ¹H-NMR-Spektrum erst nach der chemischen Reduktion mit NaCNBH₃ gemessen. Die Signale von **3a** und **3b**, vor allem das der Formylgruppe bei 8,5 ppm, sind in dem abgebildeten ¹H-NMR-Spektrum zu erkennen. Weiterhin erfolgte die chemische Reduktion bereits nach 10 min Inkubationszeit von Chanoclavin-I-Aldehyd und EasA.

5.1.3 Fortschritte in der Aufklärung des Biosynthesewegs von (8S,9S)-Fumigaclavin C in *Aspergillus fumigatus*

Wie schon in der Einleitung beschrieben, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die sieben homologen Gene in den Genclustern der verschiedenen Ergotalkaloidproduzenten für die Biosynthese des tetrazyklischen Ergolinringsystems verantwortlich sind. In dieser Arbeit konnte diese Hypothese bestätigt werden, indem mit *fgaDH*, *fgaOx3* und *fgaFS* drei weitere Gene zusätzlich zu *fgaPT2* (Unsöld & Li 2005) und *fgaMT* (Rigbers & Li 2008) durch heterologe Expression der Biosynthese von (8S,9S)-Fumigaclavin C in *A. fumigatus* zugeordnet wurden.

Der aktuelle Stand der Biosynthese von (8S,9S)-Fumigaclavin C in *A. fumigatus* ist in Abbildung 5-2 wiedergegeben. Die Biosynthese des tetrazyklischen Ergolinring-systems beginnt mit der Prenylierung von L-Tryptophan in Gegenwart von DMAPP an C-4 durch die Prenyltransferase FgaPT2 (Unsöld & Li 2005). Auf das entstandene Produkt 4-DMAT wird dann durch die N-Methyltransferase FgaMT eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) übertragen (Rigbers & Li 2008). Die einzelnen Schritte für die Umsetzung dieses Produkts 4-DMA-L-Abrin zu Chanoclavin-I-Aldehyd sind weiterhin ungeklärt. Jedoch konnte durch Inaktivierungsexperimente in *A. fumigatus* gezeigt werden, dass FgaOx1 und FgaCat in diese Reaktion/Reaktionen involviert sind (Goetz *et al.*, 2011). Eine biochemische Charakterisierung der beiden Enzyme ist bisher nicht veröffentlicht. Chanoclavin-I wird anschließend durch die Short-Chain Dehydrogenase FgaDH in Gegenwart von NAD⁺ zu Chanoclavin-I-Aldehyd oxidiert (Kapitel 4.1.1). Für die weitere Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin in *A. fumigatus* sind zwei Enzyme notwendig, FgaOx3 und FgaFS (Kapitel 4.1.3.2). Festuclavin dient dann als Vorläufer für (8S,9S)-Fumigaclavin B, das durch die Acetyltransferase FgaAT zu (8S,9S)-Fumigaclavin A umgewandelt wird (Liu *et al.*, 2009). Der Schritt von Festuclavin zu (8S,9S)-Fumigaclavin B wurde bisher nicht aufgeklärt. Da es sich aber um eine Hydroxylierung handelt, ist vermutlich das Protein FgaP450-2 für diese Reaktion verantwortlich. FgaP450-2 besitzt Homologie zu FgaP450_{pc} in *P. commune*, wobei der Pilz zwar ebenfalls Fumigaclavin A produziert, aber mit einer (8R,9S)-Konfiguration. Das Endprodukt des Ergotalkaloidbiosynthesewegs in *A. fumigatus*, (8S,9S)-Fumigaclavin C, entsteht dann durch die Prenylierung von (8S,9S)-Fumigaclavin A durch FgaPT1 (Unsöld & Li 2006).

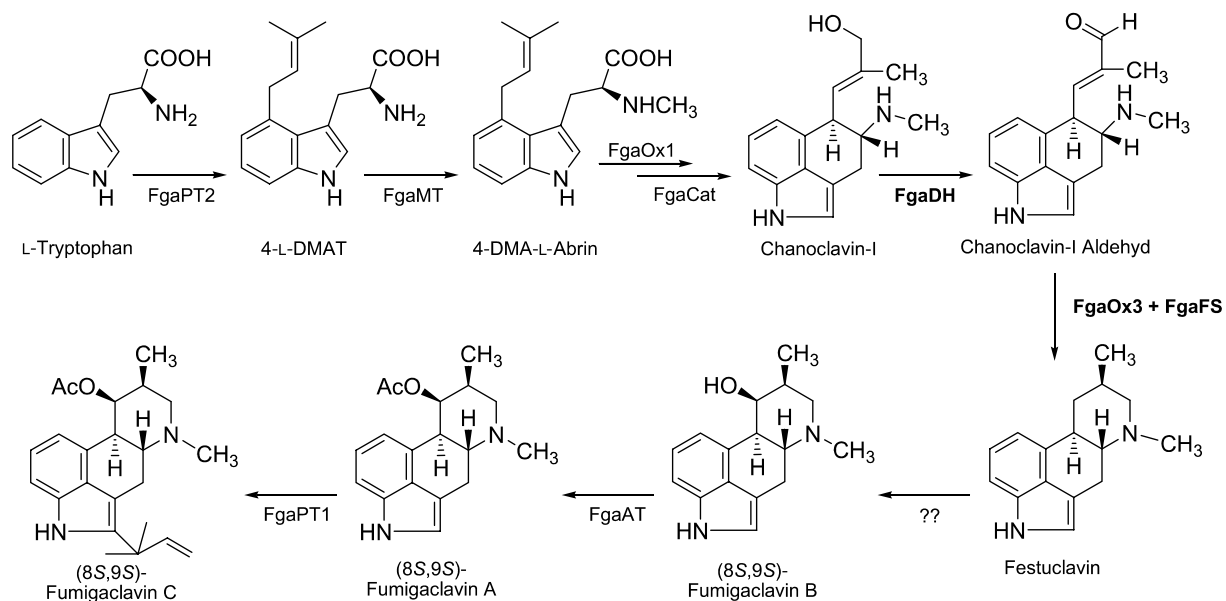


Abbildung 5-2: Die Biosynthese von Ergotalkaloiden in *Aspergillus fumigatus*. Die in dieser Dissertation charakterisierten Enzyme sind fett markiert.

Es wird angenommen, dass die homologen Proteine in *C. purpurea*, DmaW, EasF, CcsA, EasC und EasD, die gleichen Rollen bei der Biosynthese des Chanoclavin-I-Aldehyds einnehmen. Für DmaW und CcsA (Lorenz *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 1995; Tudzynski *et al.*, 1999) konnte dies auch experimentell nachgewiesen werden. Danach unterscheidet sich der Biosyntheseweg der Ergotalkaloide in *C. purpurea* von dem in *A. fumigatus* (Cheng *et al.*, 2010b; Coyle *et al.*, 2010). Statt Festuclavin wird in *C. purpurea* durch Glutathion und EasG, dem Homolog zu FgaFS, Agroclavin gebildet (Matuschek *et al.*, 2011). Die Ergebnisse aus dieser Arbeit können daher ebenfalls das Verständnis der Biosynthese von den pharmazeutisch wichtigen Ergotalkaloiden in *C. purpurea* verbessern. Das neu gewonnene Wissen könnte auch dabei helfen, durch genetische Manipulation der Produzenten die Ausbeute der klinisch genutzten Ergotalkaloide zu erhöhen oder sie für eine verbesserte Wirkung strukturell zu modifizieren.

5.1.4 Die Substratspezifität der Prenyltransferase FgaPT1

In dieser Arbeit konnte die Proteinausbeute an FgaPT1 durch Optimierung der Expressionsbedingungen verdoppelt werden. Auch der Umsatz von (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A zu (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin C durch FgaPT1 konnte von etwa 20 % auf annähernd 100 % gesteigert werden, indem das Substrat über eine Sephadex LH-20 Säule aufgereinigt wurde. Es scheint, dass sich die Produktbildung signifikant reduziert, wenn (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A während der Aufreinigung mit Säure behandelt wird. Dies wurde beispielsweise bei dem von Beate Wollinsky als Standard zur Verfügung gestellten (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A beobachtet, das mittels HPLC unter Verwendung TFA-haltiger Lösungsmittel isoliert wurde. Das in früheren Versuchen von Inge Unsöld verwendete (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A konnte ebenfalls nur zu etwa 20 % umgesetzt werden. Dieses (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A kam bei der Aufreinigung mit Salzsäure in Berührung (Unsöld & Li 2006).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Prenyltransferase FgaPT1 als Substrat alle Intermediate im Biosyntheseweg von Fumigaclavin C beginnend mit Chanoclavin-I akzeptiert. Die frühen Vorstufen L-Trp, 4-DMAT und 4-DMAT-L-Abrin werden nicht akzeptiert, ebenso keine zyklischen Tryptophan-haltigen Dipeptide oder Flavonoide. Auch Substrate mit einem größeren Substituenten an C-8 als einer Methylgruppe, wie Ergotamin und Ergometrin, werden nicht durch FgaPT1 prenyliert. Durch den größeren Substituenten könnte z.B. eine sterische Hinderung stattfinden, so dass das Substrat eventuell nicht richtig im aktiven Zentrum binden kann.

Für weitere Experimente müssen die Substrate in ausreichender Menge hergestellt werden, damit nach der Prenylierung etwa 1,5 mg Produkt für NMR-Analysen und für die Zytotoxizitätstests mit den prenylierten Substraten vorliegen. Weiterhin wird Substrat für die K_M -Wert Bestimmung benötigt. Das von Prof. Leistner zur Verfügung gestellte Agroclavin kann direkt als Substrat eingesetzt werden. Pyroclavin und Festuclavin können durch Inkubation von Chanoclavin-I mit FgaDH, FgaOx3 und EasG hergestellt werden (Matuschek *et al.*, 2012). Dabei entstehen 30 % Pyroclavin und 70 % Festuclavin. Die Isolierung sollte über Dünnschichtchromatographie erfolgen, da die Trennung mittels HPLC nicht ausreichend ist. (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A kann aus *Penicillium commune* NRRL 2033 isoliert werden. (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin B kann dann durch die Hydrolyse von (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A erhalten werden. Dies kann entweder mit dem isolierten (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A erfolgen oder direkt mit dem Pilzextrakt vor der Isolierung. Die Isolierung sollte mittels einer Sephadex LH-20 Säule oder DC erfolgen, damit (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A nicht mit Säure in Kontakt kommt.

5.2 Ein putatives Ergotalkaloidgencluster in Pilzen der Familie Arthrodermataceae

In dieser Arbeit konnten in allen bisher sequenzierten Genomen von Pilzen der Familie Arthrodermataceae fünf Gene für die Biosynthese von Ergotalkaloiden identifiziert werden. Die Sequenzen dieser fünf Gene weisen signifikante Ähnlichkeit zu denen in Pilzen der Familie Trichocomaceae, z.B. *A. fumigatus*, und Clavicipitaceae, z.B. *C. purpurea*, auf, die in die Bildung von Chanoclavin-I-Aldehyd aus L-Tryptophan involviert sind. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass das Genprodukt von einem dieser fünf homologen Gene tatsächlich die gleiche Reaktion katalysiert wie sein Homolog aus *A. fumigatus*. ChaDH aus *A. benhamiae* ist ebenso wie FgaDH aus *A. fumigatus* verantwortlich für die Oxidation von Chanoclavin-I zu seinem Aldehyd.

Zu den Genen *fgaOx3* und *fgaFS* bzw. *easG*, die in *A. fumigatus* (Wallwey *et al.*, 2010) bzw. *C. purpurea* (Matuschek *et al.*, 2011) in die weitere Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd involviert sind, konnten in den Genomen der Pilze der Familie Arthrodermataceae keine Homologen gefunden werden. Darüber hinaus zeigten die Gene in direkter Nachbarschaft zu den fünf homologen Genen keine signifikante Ähnlichkeit zu anderen bekannten Sekundärstoffwechselgenen.

Dass die benachbarten Gene mit Ausnahme von *ARB_04644* nicht exprimiert und aufgereinigt werden konnten, könnte unter Anderem an einer falschen Vorhersage der Sequenzen liegen. Da einige Gene mittels Fusions-PCR aus gDNA amplifiziert und das Intron dadurch *in vitro* entfernt wurde, konnten auch die vorhergesagten Intron/Exon-Strukturen nicht überprüft werden. Bereits bei *chaDH* zeigte sich, dass durch eine falsche Vorhersage der Intron/Exon-Struktur keine Überexpression des Gens in *E. coli* erfolgte. Für die Gene *ARB_04643*, *ARB_04644*, *ARB_04650*, *ARB_04651*, *ARB_04652* und *ARB_04653* stehen jedoch nicht wie bei *chaDH* bekannte Homologe, die bereits erfolgreich kloniert und exprimiert wurden, für Sequenzvergleiche zur Verfügung. Durch die Amplifikation der Gene aus cDNA könnte jedoch zumindest eine Überprüfung der Intron/Exon-Struktur stattfinden.

Die Inaktivität des Proteins EFE37116 könnte entweder ebenfalls in einer falsch vorhergesagten Sequenz begründet sein oder der für die katalysierte Reaktion benötigte Kofaktor wurde noch nicht identifiziert. Die Koinkubationen wurden mit FgaDH statt mit dem Homolog ChaDH aus *A. benhamiae* durchgeführt. Sollte in *A. benhamiae* eine weitere Umsetzung des Chanoclavin-I-Aldehyds nur durch eine Proteininteraktion von ChaDH mit dem nächsten Enzym im Biosyntheseweg möglich sein, könnten die Sequenzunterschiede zwischen ChaDH und FgaDH ausreichen, um diese Interaktion zu verhindern.

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die benachbarten Gene nicht in die putative Biosynthese der Ergotalkaloid in dieser Familie involviert sind und das Cluster nur aus fünf Genen besteht. Ebenfalls kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Gene, die für die weitere Umsetzung des Aldehyds verantwortlich sind, transloziert wurden und sich auf einem anderen Bereich des Genoms befinden. Dies konnte bereits bei den Genen für die Cephalosporin-Biosynthese in *Acremonium chrysogenum* beobachtet werden (Gutierrez *et al.*, 1992). Das Gencluster ist in zwei Teile aufgeteilt, die auf unterschiedlichen Bereichen des Genoms liegen. Bei dem Endprodukt des Genclusters in *A. benhamiae* handelt es sich also entweder um das Ergotalkaloidvorläufermolekül Chanoclavin-I-Aldehyd oder um ein unbekanntes Derivat von diesem.

Dies ist trotzdem nach bestem Wissen und Gewissen der erste Bericht über Ergotalkaloide in Pilzen der Familie Arthrodermataceae. Damit wurde die Anzahl an Familien, die die genetischen Informationen für die Biosynthese von Ergotalkaloiden besitzen, um eine pilzlichen Familie erweitert. Es scheint, dass jede Familie überwiegend eine einzige Gruppe von Ergotalkaloiden produziert. Die Mitglieder der Familie Trichocomaceae bilden Alkaloide vom Clavin-Typ, während in Pilzen der Familie Clavicipitaceae Ergoamide und/oder Ergopeptine gefunden wurden. Falls Pilze der Familie Arthrodermataceae tatsächlich Ergotalkaloide bzw. ergotalkaloidähnliche Substanzen produzieren, besitzt diese Substanzgruppe sehr wahrscheinlich nur ein Ringsystem mit drei Ringen oder einen im Vergleich zum Ergolinringsystem sehr stark modifizierten vierten Ring.

Die Ergebnisse des Northern Blots und der Analyse der Kulturüberstände von *A. benhamiae* mittels HPLC bzw. DC legen nahe, dass die Gene aus dem Ergotalkaloidcluster zumindest unter den in dieser Arbeit ausgewählten Bedingungen nur sehr schwach oder gar nicht exprimiert wurden. Die schwachen Signale bei der Northern Blot-Analyse könnten auch durch unspezifische Hybridisierungen hervorgerufen worden sein. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die meisten pilzlichen Biosynthesegencluster unter Standard-Laborbedingungen nicht exprimiert werden (Brakhage & Schroeckh 2011). Die für die Genexpression benötigten Bedingungen sind meistens unbekannt und schwierig vorherzusagen. Damit besteht trotzdem weiterhin die Möglichkeit, dass Chanoclavin-I-Aldehyd *in vivo* zu einer unbekannten Substanz umgesetzt wird, deren Struktur jedoch aufgrund der nicht vorhandenen Genexpression nicht bestimmt werden kann. Würde es gelingen, das Gencluster wieder anzuschalten, z.B. durch Kokultivierung, Promotoraustauschversuche oder Überexpression von Transkriptionsfaktoren (Bergmann *et al.*, 2010; Brakhage & Schroeckh 2011), könnte man das Endprodukt der Biosynthese in Pilzen der Familie Arthrodermataceae eventuell identifizieren. Der Versuch der Aktivierung

des Genclusters durch Kokultivierung mit Keratinozyten war in dieser Arbeit nicht erfolgreich.

Es besteht auch noch die Möglichkeit, dass die Pilze der Familie Arthrodermataceae Ergotalkaloide nicht benötigen (Sie müssen z.B. keine Schädlinge von ihrem Wirt fernhalten) und das Gencluster tatsächlich auch unter natürlichen Bedingungen nicht exprimiert wird. Unter diesen Voraussetzungen wäre es auch wahrscheinlicher, dass die Mutationen, die in einigen Genen des putativen Genclusters bei Pilzen der Familie Arthrodermataceae aufgefallen sind (Kapitel 4.3.1) und vorerst als Sequenzierungsfehler betrachtet worden sind, tatsächlich im Genom vorliegen. Da die Mutationen in einem stillen Gencluster keine Auswirkungen auf den Organismus haben, erfolgte evolutionär keine Selektion. Auch könnten nach dieser Hypothese weitere Homologe während der Evolution z.B. durch Deletion verloren gegangen sein. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass das Enzym ChaDH, trotz der vielen Mutationen im Vergleich zu FgaDH, weiterhin Aktivität aufweist. Es ist eher unwahrscheinlich, dass sämtliche während der Evolution aufgetretenen Mutationen keine Auswirkungen auf die Aktivität hatten. Wahrscheinlicher ist, dass eine evolutionäre Selektion für den Erhalt der Enzymaktivität verantwortlich ist.

6 Referenzen

- Abe, M., Ohmomo, S., Ohashi, T. & Tabuchi, T. (1969).** Isolation of chanoclavine-(I) and two new interconvertible alkaloids, rugulovasine A and B, from the cultures of *Penicillium concavo-rugulosum*. *Agri. Biol. Chem.* **33**, 469-471.
- Ahimsa-Müller, M. A., Markert, A., Hellwig, S., Knoop, V., Steiner, U., Drewke, C. & Leistner, E. (2007).** Clavicipitaceous fungi associated with ergoline alkaloid-containing convolvulaceae. *J. Nat. Prod.* **70**, 1955-1960.
- Bacetty, A. A., Snook, M. E., Glenn, A. E., Noe, J. P., Hill, N., Culbreath, A., Timper, P., Nagabhyru, P. & Bacon, C. W. (2009).** Toxicity of endophyte-infected tall fescue alkaloids and grass metabolites on *Pratylenchus scribneri*. *Phytopathology* **99**, 1336-1345.
- Bach, N. J., Boaz, H. E., Kornfeld, E. C., Chang, C. J., Floss, H. G., Hagaman, E. W. & Wenkert, E. (1974).** Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of naturally occurring substances. XXI. Nuclear magnetic resonance spectral analysis of the ergot alkaloids. *J. Org. Chem.* **39**, 1272-1276.
- Banks, G. T., Mantle, P. G. & Szczyrbak, C. A. (1974).** Large-scale production of clavine alkaloids by *Claviceps fusiformis*. *J. Gen. Microbiol.* **82**, Pt. 2, 345-361.
- Bergmann, S., Funk, A. N., Scherlach, K., Schroeckh, V., Shelest, E., Horn, U., Hertweck, C. & Brakhage, A. A. (2010).** Activation of a silent fungal polyketide biosynthesis pathway through regulatory cross talk with a cryptic nonribosomal peptide synthetase gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 8143-8149.
- Boichenko, L. V., Zelenkova, N. F., Arinbasarov, M. U. & Reshetilova, T. A. (2003).** Optimization of conditions for storage and cultivation of the fungus *Claviceps* sp., a producer of the ergot alkaloid agroclavine. *Appl. Biochem. Microbiol.* **39**, 294-299.
- Bonuccelli, U., Del Dotto, P. & Rascol, O. (2009).** Role of dopamine receptor agonists in the treatment of early Parkinson's disease. *Parkins. Rel. Disord* **15S**, S44-S53.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brakhage, A. A. & Schroeckh, V. (2011).** Fungal secondary metabolites - strategies to activate silent gene clusters. *Fungal. Genet. Biol.* **48**, 15-22.
- Cheng, J. Z., Coyle, C. M., Panaccione, D. G. & O'Connor, S. E. (2010a).** A role for old yellow enzyme in ergot alkaloid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 1776-1777.
- Cheng, J. Z., Coyle, C. M., Panaccione, D. G. & O'Connor, S. E. (2010b).** Controlling a structural branch point in ergot alkaloid biosynthesis. *J Am. Chem. Soc.* **132**, 12835-12837.

- Cole, R. J., Dorner, J. W., Cox, R. H. & Raymond, L. W. (1983).** Two classes of alkaloid mycotoxins produced by *Penicillium crustosum* Thom isolated from contaminated beer. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 655-657.
- Cole, R. J., Kirksey, J. W., Dorner, J. W., Wilson, D. M. et al. (1977a).** Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* isolated from silage. *Ann. Nutr. Aliment.* **31**, 685-691.
- Cole, R. J., Kirksey, J. W., Dorner, J. W., Wilson, D. M. et al. (1977b).** Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage. *J. Agr. Food Chem.* **25**, 826-830.
- Cole, R. J., Kirksey, J. W., Weinreb, S. M., Singh, P., Kim, D., Clardy, J. & Eickman, N. (1976).** Structures of rugulovasine-A and -B and 8-chlororugulovasine-A and -B. *Tetrahedron Lett.* **17**, 3849-3852.
- Cole, R. J. & Schweikert, M. A. (2003).** Indole Alkaloids. In *Handbook of secondary fungal metabolites*, pp. 1-143. Elsevier Science.
- Corre, C. & Challis, G. L. (2009).** New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. *Nat. Prod. Rep.* **26**, 977-986.
- Correia, T., Grammel, N., Ortel, I., Keller, U. & Tudzynski, P. (2003).** Molecular cloning and analysis of the ergopeptine assembly system in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Chem. Biol.* **10**, 1281-1292.
- Coyle, C. M., Cheng, J. Z., O'Connor, S. E. & Panaccione, D. G. (2010).** An old yellow enzyme gene that controls the branch point between *Aspergillus fumigatus* and *Claviceps purpurea* ergot alkaloid pathways. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 3898-3903.
- Coyle, C. M., Kenaley, S. C., Rittenour, W. R. & Panaccione, D. G. (2007).** Association of ergot alkaloids with conidiation in *Aspergillus fumigatus*. *Mycologia.* **99**, 804-811.
- Curran, M. P. & Perry, C. M. (2004).** Cabergoline: a review of its use in the treatment of Parkinson's disease. *Drugs* **64**, 2125-2141.
- De Costa, C. (2002).** St Anthony's fire and living ligatures: a short history of ergometrine. *Lancet* **359**, 1768-1770.
- de Groot, A. N., van Dongen, P. W., Vree, T. B., Hekster, Y. A. & van, R. J. (1998).** Ergot alkaloids. Current status and review of clinical pharmacology and therapeutic use compared with other oxytocics in obstetrics and gynaecology. *Drugs* **56**, 523-535.
- Dorner, J. W., Cole, R. J., Hill, R., Wicklow, D. & Cox, R. H. (1980).** *Penicillium rubrum* and *Penicillium biforme*, new sources of rugulovasines A and B. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 685-687.

- Du, L. & Lou, L. (2010).** PKS and NRPS release mechanisms. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 255-278.
- Fleetwood, D. J., Scott, B., Lane, G. A., Tanaka, A. & Johnson, R. D. (2007).** A complex ergovaline gene cluster in epichloe endophytes of grasses. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2571-2579.
- Flieger, M., Wurst, M. & Shelby, R. (1997).** Ergot alkaloids--sources, structures and analytical methods. *Folia Microbiol. (Praha)* **42**, 3-30.
- Floss, H. G. (1976).** Biosynthesis of ergot alkaloids and related compounds. *Tetrahedron* **32**, 873-912.
- Floss, H. G., Tscheng-Lin, M., Chang, C., Naidoo, B., Balir, G. E., Abou-Chaar, C. I. & Cassady, J. M. (1974).** Biosynthesis of ergot alkaloids. Studies on the mechanism of the conversion of chanoclavine-I into tetracyclic ergolines. *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 1898-1909.
- Friebolin, H. (1999).** One and Two Dimensional NMR Spectroscopy: An Introduction., pp. 301-329. Wiley-VCH Weinheim.
- Frisvad, J. C., Rank, C., Nielsen, K. F. & Larsen, T. O. (2009).** Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* **47**, S53-S71.
- Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen, T. O. & Samson, R. A. (2004).** Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud. Mycol.* **49**, 201-241.
- Furuta, T., Koike, M. & Abe, M. (1982).** Isolation of Cycloclavine from the Culture Broth of *Aspergillus japonicus* SAITO. *Agri. Biol. Chem.* **46**, 1921-1922.
- Ge, H. M., Yu, Z. G., Zhang, J., Wu, J. H. & Tan, R. X. (2009).** Bioactive alkaloids from endophytic *Aspergillus fumigatus*. *J. Nat. Prod.* **72**, 753-755.
- Goetz, K. E., Coyle, C. M., Cheng, J. Z., O'Connor, S. E. & Panaccione, D. G. (2011).** Ergot cluster-encoded catalase is required for synthesis of chanoclavine-I in *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Genet.* **57**, 201-211.
- Gröger, D. & Floss, H. G. (1998).** Biochemistry of ergot alkaloids - Achievements and challenges . *The Alkaloids, Chem. Biol.* **50**, 171-218.
- Gutierrez, S., Velasco, J., Fernandez, F. J. & Martin, J. F. (1992).** The cefG gene of *Cephalosporium acremonium* is linked to the cefEF gene and encodes a deacetylcephalosporin C acetyltransferase closely related to homoserine O-acetyltransferase. *J. Bacteriol.* **174**, 3056-3064.
- Haarmann, T., Lorenz, N. & Tudzynski, P. (2008).** Use of a nonhomologous end joining deficient strain (Deltaku70) of the ergot fungus *Claviceps purpurea* for identification of a nonribosomal peptide synthetase gene involved in ergotamine biosynthesis. *Fungal. Genet. Biol.* **45**, 35-44.

- Haarmann, T., Machado, C., Lübke, Y., Correia, T., Schardl, C. L., Panaccione, D. G. & Tudzynski, P. (2005).** The ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*: Extension of the cluster sequence and intra species evolution. *Phytochemistry* **66**, 1312-1320.
- Haarmann, T., Ortel, I., Tudzynski, P. & Keller, U. (2006).** Identification of the cytochrome P450 monooxygenase that bridges the clavine and ergoline alkaloid pathways. *Chembiochem.* **7**, 645-652.
- Haarmann, T., Rolke, Y., Giesbert, S. & Tudzynski, P. (2009).** Ergot: from witchcraft to biotechnology. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 563-577.
- Halker, R., Vargas, B. & Dodick, D. W. (2010).** Cluster headache: diagnosis and treatment. *Semin. Neurol.* **30**, 175-185.
- Hassam, S. B. & Floss, H. G. (1981).** Biosynthesis of ergot alkaloids. Incorporation of (17R)-(17-³H)- and (17S)-(17-³H) chanoclavine-I into elymoclyvine by *Claviceps*. *J. Nat. Prod.* **44**, 756-758.
- Hoffmeister, D. & Keller, N. P. (2007).** Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 393-416.
- Hofmann, A. (1980)** *LSD - My problem child*. New York: McGraw-Hill.
- Holtzhauser, M. & Behlke, J. (1996)** *Methoden in der Proteinanalytik*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Huang, X., Holden, H. M. & Raushel, F. M. (2001).** Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 149-180.
- Janardhanan, K. K., Sattar, A. & Husain, A. (1984).** Production of fumigaclavine A by *Aspergillus tamarii* Kita. *Can. J. Microbiol.* **30**, 247-250.
- Jez, J. M., Ferrer, J. L., Bowman, M. E., Dixon, R. A. & Noel, J. P. (2000).** Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* **39**, 890-902.
- Jones, M. G. (2007).** The first filamentous fungal genome sequences: *Aspergillus* leads the way for essential everyday resources or dusty museum specimens? *Microbiology* **153**, 1-6.
- Jörnvall, H. (2008).** Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: MDR and SDR gene and protein superfamilies. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 3873-3878.
- Jourdan, G., Verwaerde, P., Pathak, A., Tran, M. A., Montastruc, J. L. & Senard, J. M. (2007).** In vivo pharmacodynamic interactions between two drugs used in orthostatic hypotension--midodrine and dihydroergotamine. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **21**, 45-53.
- Katzung, B. G. (2009).** Histamine, serotonin and the ergot alkaloids. In *Basic and Clinical Pharmacology*, pp. 271-292. Edited by. B. G. Katzung, S. B. Masters & A. J.

Trevor McGraw-Hill Medical.

Kavanagh, K. L., Jornvall, H., Persson, B. & Oppermann, U. (2008). The SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 3895-3906.

Kawai, K., Nozawa, K., Yamaguchi, T., Nakajima, S. & Udagawa, S. (1992). Two chemotypes of *Penicillium crustosum* based on the analysis of indolic components. *Mycotoxins* **36**, 19-24.

Keller, N. P., Turner, G. & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 937-947.

Kren, V., Pazoutova, S., Sedmera, P., Rylko, V. & Rehacek, Z. (1986). High-production mutant *Claviceps purpurea* 59 accumulating secoclavines. *FEMS Microbiol. Lett.* **37**, 31-34.

Kucht, S., Gross, J., Hussein, Y., Grothe, T., Keller, U., Basar, S., König, W. A., Steiner, U. & Leistner, E. (2004). Elimination of ergoline alkaloids following treatment of *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) with fungicides. *Planta* **219**, 619-625.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lee, M. R. (2009a). The history of ergot of rye (*Claviceps purpurea*) I: from antiquity to 1900. *J R. Coll. Physicians Edinb.* **39**, 179-184.

Lee, M. R. (2009b). The history of ergot of rye (*Claviceps purpurea*) II: 1900-1940. *J R. Coll. Physicians Edinb.* **39**, 365-369.

Lee, M. R. (2010). The history of ergot of rye (*Claviceps purpurea*) III: 1940-80. *J R. Coll. Physicians Edinb.* **40**, 77-80.

Leistner, E. & Steiner, U. (2009). Fungal origin of ergoline alkaloids present in dicotyledonous plants (Convolvulaceae). In *The Mycota XV: Physiology and Genetics*, pp. 197-208. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Li, S.-M. (2009). Evolution of aromatic prenyltransferases in the biosynthesis of indole derivatives. *Phytochemistry* **70**, 1746-1757.

Li, S.-M. & Unsöld, I. A. (2006). Post genome research on the biosynthesis of ergot alkaloids. *Planta Med.* **72**, 1117-1120.

Liu, X., Wang, L., Steffan, N., Yin, W.-B. & Li, S.-M. (2009). Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: FgaAT catalyses the acetylation of fumigaclavine B. *Chembiochem* **10**, 2325-2328.

Lorenz, N., Haarmann, T., Pazoutova, S., Jung, M. & Tudzynski, P. (2009). The ergot alkaloid gene cluster: Functional analyses and evolutionary aspects. *Phytochemistry* **70**, 1822-1932.

- Lorenz, N., Olšovská, J., Šulc, M. & Tudzynski, P. (2010).** The alkaloid cluster gene *ccsA* of the ergot fungus *Claviceps purpurea* encodes the chanoclavine-I-synthase, an FAD-containing oxidoreductase mediating the transformation of N-methyl-dimethylallyltryptophan to chanoclavine-I. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 1822-1830.
- Lorenz, N., Wilson, E. V., Machado, C., Schardl, C. L. & Tudzynski, P. (2007).** Comparison of ergot alkaloid biosynthesis gene clusters in *Claviceps* species indicates loss of late pathway steps in evolution of *C. fusiformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7185-7191.
- Lovell, B. V. & Marmura, M. J. (2010).** New therapeutic developments in chronic migraine. *Curr. Opin. Neurol.* **23**, 254-258.
- Luzhetska, M., Härle, J. & Bechthold, A. (2010).** Combinatorial and synthetic biosynthesis in actinomycetes. *Fortschr. Chem Org. Naturstoffe* **93**, 211-237.
- Ma, H. Y., Song, Y. C., Mao, Y. Y., Jiang, J. H., Tan, R. X. & Luo, L. (2006).** Endophytic fungal metabolite fumigaclavine C causes relaxation of isolated rat aortic rings. *Planta Med.* **72**, 387-392.
- Maier, W., Erge, D., Schmidt, J. & Groger, D. (1980).** A blocked mutant of *Claviceps purpurea* accumulating chanoclavine-I-aldehyde. *Experientia* **36**, 1353-1354.
- Markert, A., Steffan, N., Ploss, K., Hellwig, S., Steiner, U., Drewke, C., Li, S.-M., Boland, W. & Leistner, E. (2008).** Biosynthesis and accumulation of ergoline alkaloids in a mutualistic association between *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) and a Clavicipitalean fungus. *Plant Physiol.* **147**, 296-305.
- Martinez-Martin, P. & Kurtis, M. M. (2009).** Systematic review of the effect of dopamine receptor agonists on patient health-related quality of life. *Parkinsonism. Relat Disord* **15 Suppl 4**, S58-S64.
- Matuschek, M., Wallwey, C., Wollinsky, B., Xie, X. & Li, S.-M. (2012).** *In vitro* conversion of chanoclavine-I aldehyde to the stereoisomers festuclavine and pyroclavine controlled by the second reduction step. *RSC Advances* DOI:10.1039/C2RA20104F.
- Matuschek, M., Wallwey, C., Xie, X. & Li, S.-M. (2011).** New insights into ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps purpurea*: an agroclavine synthase EasG catalyses, via a non-enzymatic adduct with reduced glutathione, the conversion of chanoclavine-I aldehyde to agroclavine. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 4328-4335.
- Metzger, U., Schall, C., Zocher, G., Unsöld, I., Stec, E., Li, S.-M., Heide, L. & Stehle, T. (2009).** The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 14309-14314.
- Möller, T., Åkerstrand, K. & Massoud, T. (1997).** Toxin-producing species of *Penicillium* and the development of mycotoxins in must and homemade wine. *Nat. Toxins.* **5**, 86-89.

Naidoo, B., Cassady, J. M., Blair, G. E. & Floss, H. G. (1970). Biosynthesis of ergot alkaloids. Synthesis of chanoclavine-I-aldehyde and its incorporation into elymoclavine by *Claviceps*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 471-472.

Nakahara, Y., Niwaguchi, T. & Ishii, H. (1977). Studies on lysergic acid diethylamide and related compounds. V. Syntheses of dihydrolysergic acid diethylamides and related compounds. *Chem. Pharm. Bull.* **25**, 1756-1763.

Nierman, W. C., Pain, A., Anderson, M. J., Wortman, J. R. et al. (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **438**, 1151-1156.

O'Brien, M., Nielsen, K. F., O'Kiely, P., Forristal, P. D., Fuller, H. T. & Frisvad, J. C. (2006). Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 9268-9276.

Ohmomo, S., Kaneko, M. & Atthasampunna, P. (1989). Production of fumigaclavine B by a thermophilic strain of *Aspergillus fumigatus*. *MIRCEN J. Appl. Microbiol. Biotechn.* **5**, 5-13.

Oppermann, U. C., Filling, C., Berndt, K. D., Persson, B., Benach, J., Ladenstein, R. & Jornvall, H. (1997). Active site directed mutagenesis of 3 beta/17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase establishes differential effects on short-chain dehydrogenase/reductase reactions. *Biochemistry* **36**, 34-40.

Ortel, I. & Keller, U. (2009). Combinatorial assembly of simple and complex D-lysergic acid alkaloid peptide classes in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *J. Biol. Chem.* **284**, 6650-6660.

Osborn, A. (2010). Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends Genet.* **26**, 449-457.

Panaccione, D. G. & Coyle, C. M. (2005). Abundant respirable ergot alkaloids from the common airborne fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3106-3111.

Panaccione, D. G., Johnson, R. D., Wang, J., Young, C. A., Damrongkool, P., Scott, B. & Schardl, C. L. (2001). Elimination of ergovaline from a grass-*Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 12820-12825.

Pažoutová, S., Flieger, M., Sajdl, P., Rehacek, Z., Taisinger, J. & Bass, A. (1981). The relationship between intensity of oxidative metabolism and predominance of agroclavine or elymoclavine in submerged *Claviceps purpurea* cultures. *J. Nat. Prod.* **44**, 225-235.

Pedrosa, K. & Griebler, K. (2010). Ergot alkaloids of increasing concern. *Feed Intern.* September/October, 28-30.

Pertz, H. (1996). Naturally occurring clavines: antagonism/partial agonism at 5-HT_{2A}

receptors and antagonism at alpha 1-adrenoceptors in blood vessels. *Planta Med.* **62**, 387-392.

Plieninger, H., Meyer, E., Maier, W. & Gröger, D. (1978). Über den Einbau von [4'-(E)-¹³C]4-[3-Methyl-2-butenyl]tryptophan in Clavinalkaloide und Lysergsäure. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1978**, 813-817.

Pretsch, E., Bühlmann, P. & Affolter, C. (2000) *Struture determination of organic compounds*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

Rajan, P. V. & Wing, D. A. (2010). Postpartum hemorrhage: Evidence-based medical interventions for prevention and treatment. *Clin. Obst. Gyn.* **53**, 165-181.

Rigbers, O. & Li, S.-M. (2008). Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: overproduction and biochemical characterisation of a 4-dimethylallyltryptophan N-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **283**, 26859-26868.

Robertson, C. E., Black, D. F. & Swanson, J. W. (2010). Management of migraine headache in the emergency department. *Semin. Neurol.* **30**, 201-211.

Sajdl, P. & Reháček, Z. (1975). Cyclization of chanoclavine-I by cell-free preparations from saprophytic *Claviceps* strains. *Folia Microbiol. (Praha)* **20**, 365-367.

Sakharovsky, V. G. & Kozlovsky, A. G. (1983). The study of costaclavine and epicostaclavine structure by ¹H NMR. *J. Structumoy Khimii (in Russian)* **24**, 100-105.

Saper, J. R. & Silberstein, S. (2006). Pharmacology of dihydroergotamine and evidence for efficacy and safety in migraine. *Headache* **46 Suppl 4**, S171-S181.

Schardl, C. L. (2001). *Epichloë festucae* and related mutualistic symbionts of grasses. *Fungal. Genet. Biol.* **33**, 69-82.

Schardl, C. L., Leuchtmann, A. & Spiering, M. J. (2004). Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 315-340.

Schardl, C. L., Panaccione, D. G. & Tudzynski, P. (2006). Ergot alkaloids--biology and molecular biology. *The Alkaloids, Chem. Biol.* **63**, 45-86.

Schardl, C. L., Scott, B., Florea, S. & Zhang, D. (2009). *Epichloë* endophytes: Clavicipitaceous symbionts of grasses. In *The Mycota V: Plant Relationships*, pp. 275-306. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Schiff, P. L. (2006). Ergot and its alkaloids. *Am. J. Pharma. Edu.* **70**, 1-10.

Schumann, B., Erge, D., Maier, W. & Groeger, D. (1982). A new strain of *Claviceps purpurea* accumulating tetracyclic clavine alkaloids. *Planta Med.* **45**, 11-14.

Setnikar, I., Schmid, K., Rovati, L. C., Vens-Cappell, B., Mazur, D. & Kozak, I. (2001). Bioavailability and pharmacokinetic profile of dihydroergotoxine from a tablet and from an oral solution formulation. *Arzneimittelforschung.* **51**, 2-6.

- Sinz, A. (2008).** Die Bedeutung der Mutterkorn-Alkaloide als Arzneistoffe. *Pharmazie in unserer Zeit* **37**, 306-309.
- Spilsbury, J. F. & Wilkinson, S. (1961).** Isolation of festuclavine and two new clavine alkaloids from *Aspergillus fumigatus*. *J. Chem. Soc.* 2085-2091.
- Stack, D., Neville, C. & Doyle, S. (2007).** Nonribosomal peptide synthesis in *Aspergillus fumigatus* and other fungi. *Microbiology* **153**, 1297-1306.
- Stauffacher, D. & Tscherter, H. (1964).** Isomere des Chanoclavines aus *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL. (*Secale cornutum*). *Helv. Chim. Acta* **47**, 2186-2194.
- Steffan, N., Grundmann, A., Yin, W.-B., Kremer, A. & Li, S.-M. (2009).** Indole prenyltransferases from fungi: a new enzyme group with high potential for the production of prenylated indole derivatives. *Curr. Med. Chem.* **16**, 218-231.
- Steiner, U., Leibner, S., Schardl, C. L., Leuchtmann, A. & Leistner, E. (2011).** *Periglandula*, a new fungal genus within the Clavicipitaceae and its association with Convolvulaceae. *Mycologia* **103**, 1133-1145.
- Tsai, H. F., Wang, H., Gebler, J. C., Poulter, C. D. & Schardl, C. L. (1995).** The *Claviceps purpurea* gene encoding dimethylallyltryptophan synthase, the committed step for ergot alkaloid biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 119-125.
- Tscherter, H. & Hauth, H. (1974).** Three new ergot alkaloids from saprophytic culture of *Claviceps paspali* Stevens et Hall. *Helv. Chim. Acta* **57**, 113-121.
- Tudzynski, P., Holter, K., Correia, T., Arntz, C., Grammel, N. & Keller, U. (1999).** Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 133-141.
- Uhlig, S. & Petersen, D. (2008).** Lactam ergot alkaloids (ergopeptams) as predominant alkaloids in sclerotia of *Claviceps purpurea* from Norwegian wild grasses. *Toxicon* **52**, 175-185.
- Unsöld, I. A. (2006).** Molecular biological and biochemical investigations on the biosynthesis of fumigaclavines in *Aspergillus fumigatus* AF 293 / B 5233 and *Penicillium commune* NRRL2033. *Dissertation Universität Tübingen*.
- Unsöld, I. A. & Li, S.-M. (2005).** Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **151**, 1499-1505.
- Unsöld, I. A. & Li, S.-M. (2006).** Reverse prenyltransferase in the biosynthesis of fumigaclavine C in *Aspergillus fumigatus*: gene expression, purification and characterization of fumigaclavine C synthase FgaPT1. *Chembiochem* **7**, 158-164.
- van Dongen, P. W. & de Groot, A. N. (1995).** History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **60**, 109-116.
- Vinokurova, N. G., Boichenko, L. V. & Arinbasarov, M. U. (2003a).** Production of alkaloids by fungi of the genus *Penicillium* grown on wheat grain. *Appl. Biochem.*

Microbiol. **39**, 403-406.

Vinokurova, N. G., Ozerskaya, S. M., Baskunov, B. P. & Arinbasarov, M. U. (2003b). The *Penicillium commune* Thom and *Penicillium clavigerum* demelius fungi producing fumigaclavines A and B. *Microbiology (Moscow)* **72**, 149-151.

Vinokurova, N. G., Reshetilova, T. A., Adanin, V. M. & Kozlovskii, A. G. (1991). Alkaloid composition of *Penicillium palitans* and *Penicillium oxalicum*. *Appl. Biochem. Microbiol.* **27**, 644-648.

von Döhren, H. (2004). Biochemistry and general genetics of nonribosomal peptide synthetases in fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **88**, 217-264.

Wallwey, C. & Li, S.-M. (2011). Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 496-510.

Wallwey, C., Matuschek, M., Xie, X.-L. & Li, S.-M. (2010). Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: Conversion of chanoclavine-I aldehyde to festuclavine by the festuclavine synthase FgaFS in the presence of the old yellow enzyme FgaOx3. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 3500-3508.

Walsh, C. T. & Fischbach, M. A. (2010). Natural products version 2.0: Connecting genes to molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 2469-2493.

Wang, J., Machado, C., Panaccione, D. G., Tsai, H. F. & Schardl, C. L. (2004). The determinant step in ergot alkaloid biosynthesis by an endophyte of perennial ryegrass. *Fungal Genet. Biol.* **41**, 189-198.

Williams, R. M., Stocking, E. M. & Sanz-Cervera, J. F. (2000). Biosynthesis of prenylated alkaloids derived from tryptophan. *Topics Curr. Chem.* **209**, 97-173.

Wu, X.-F., Fei, M.-J., Shu, R.-G., Tan, R.-X. & Xu, Q. (2005). Fumigaclavine C, an fungal metabolite, improves experimental colitis in mice via downregulating Th1 cytokine production and matrix metalloproteinase activity. *Int. Immunopharmacol.* **5**, 1543-1553.

Yamatodani, S., Asahi, Y., Matsukura, A., Ohmomo, S. & Abe, M. (1970). Structure of rugulovasine A, B, and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.* **34**, 485-487.

Zhao, Y., Liu, J., Wang, J., Wang, L., Yin, H., Tan, R. & Xu, Q. (2004). Fumigaclavine C improves concanavalin A-induced liver injury in mice mainly via inhibiting TNF- α production and lymphocyte adhesion to extracellular matrices. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**, 775-782.

Zhelifonova, V. P., Antipova, T. V., Ozerskaya, S. M., Kochkina, G. A. & Kozlovsky, A. G. (2009). Secondary metabolites of *Penicillium* fungi isolated from permafrost deposits as chemotaxonomic markers. *Microbiology (Moscow)* **78**, 350-354.

7 Anhang

7.1 MS- und NMR-Spektren der isolierten Substanzen aus der FgaDH-Reaktion

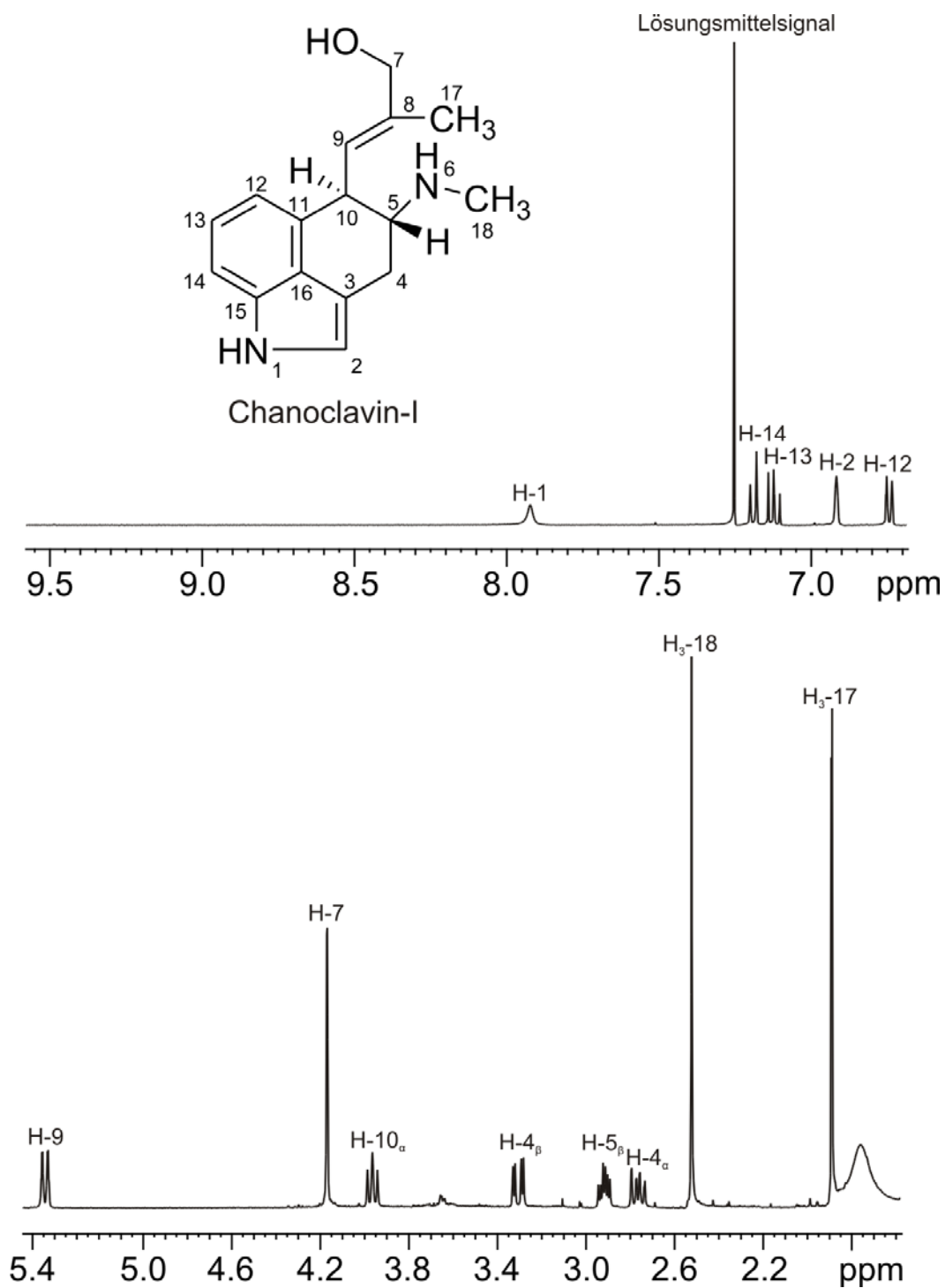


Abbildung 7-1: ^1H -NMR-Spektrum von Chanoclavin-I in CDCl_3 , isoliert aus dem Reaktionsansatz mit FgaDH und deprotoniert mit Ammoniumhydroxid.

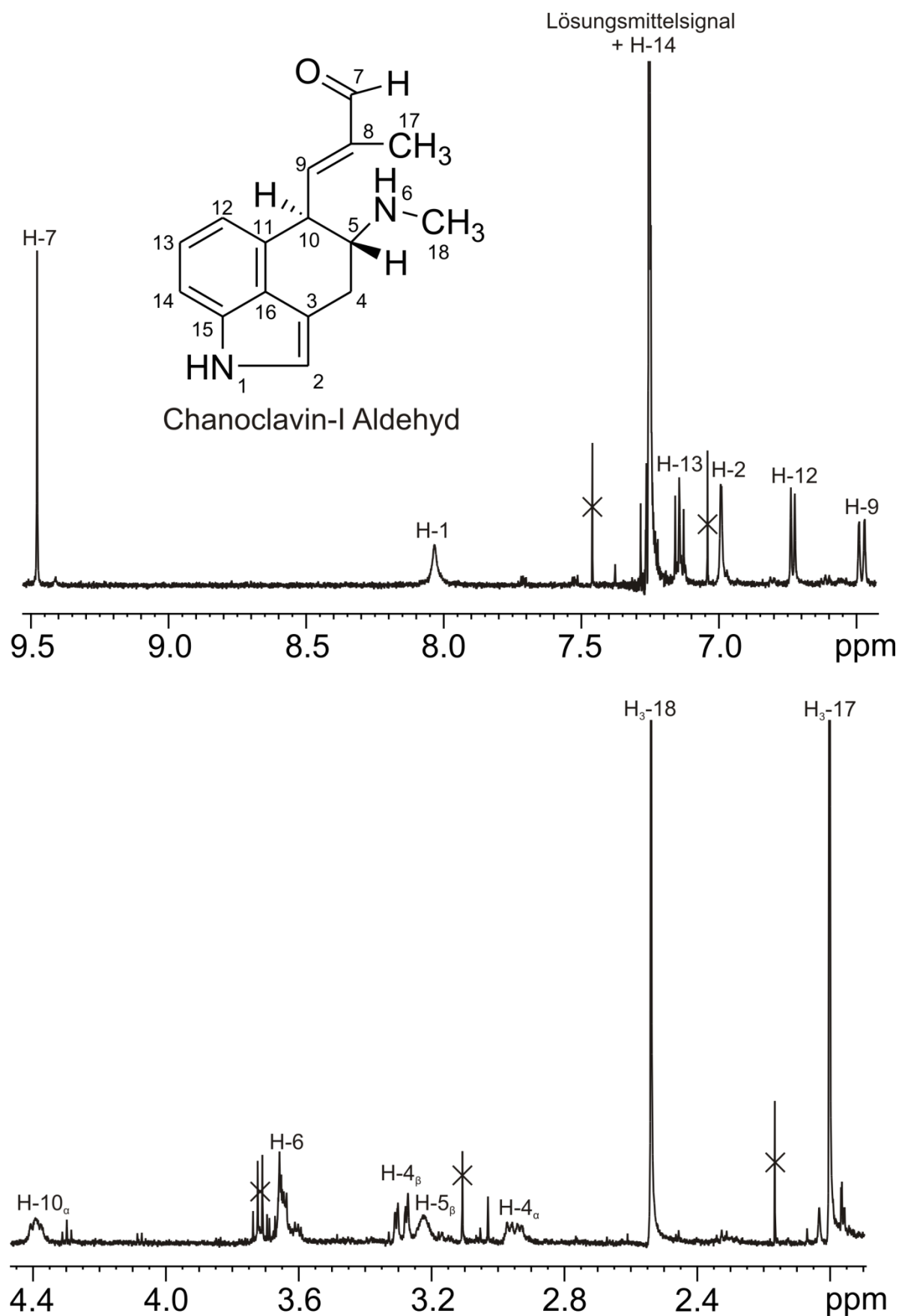


Abbildung 7-2: ^1H -NMR-Spektrum von Chanoclavin-I-Aldehyd in CDCl_3 , isoliert aus dem Reaktionsansatz mit FgaDH und deprotoniert mit Ammoniumhydroxid.

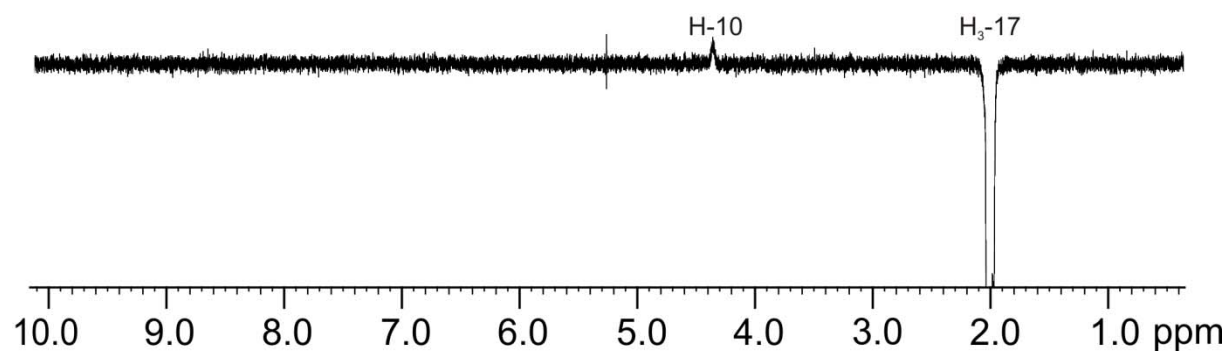


Abbildung 7-3: DPGSE-NOE-Spektrum von Chanoclavin-I-Aldehyd.

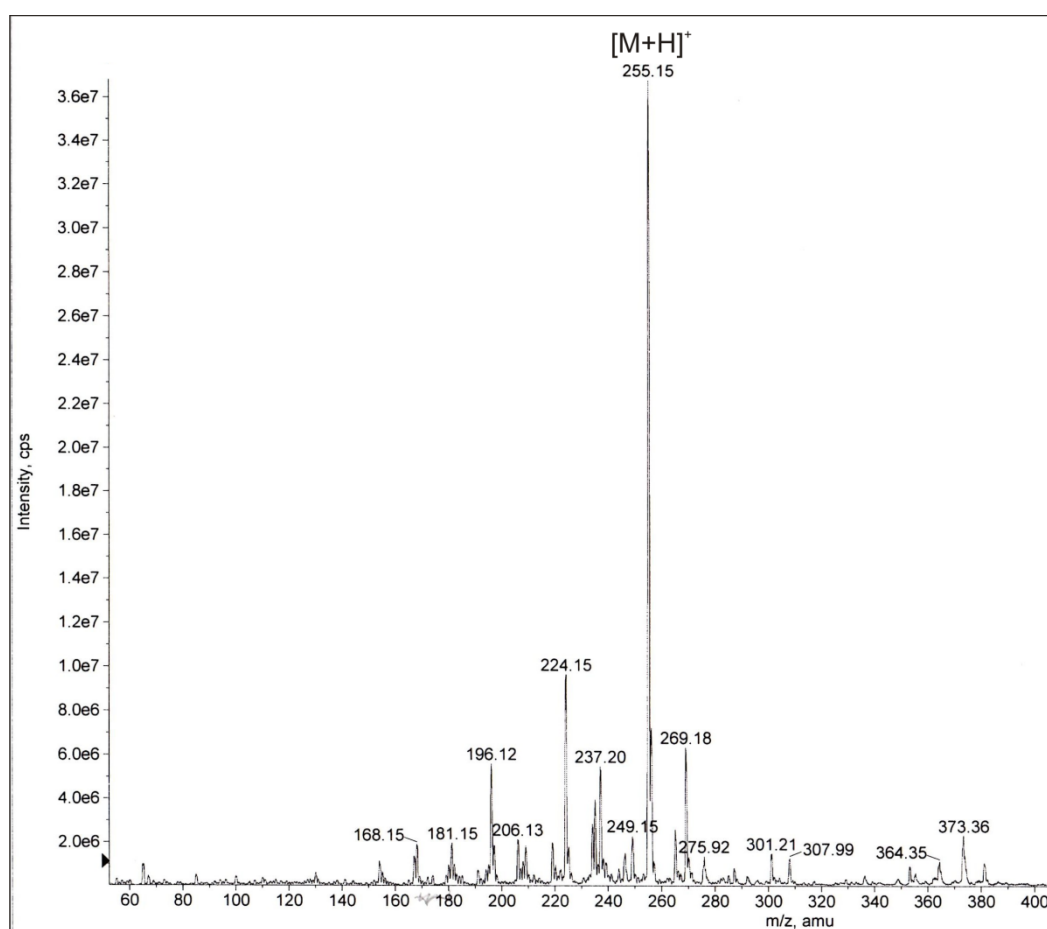
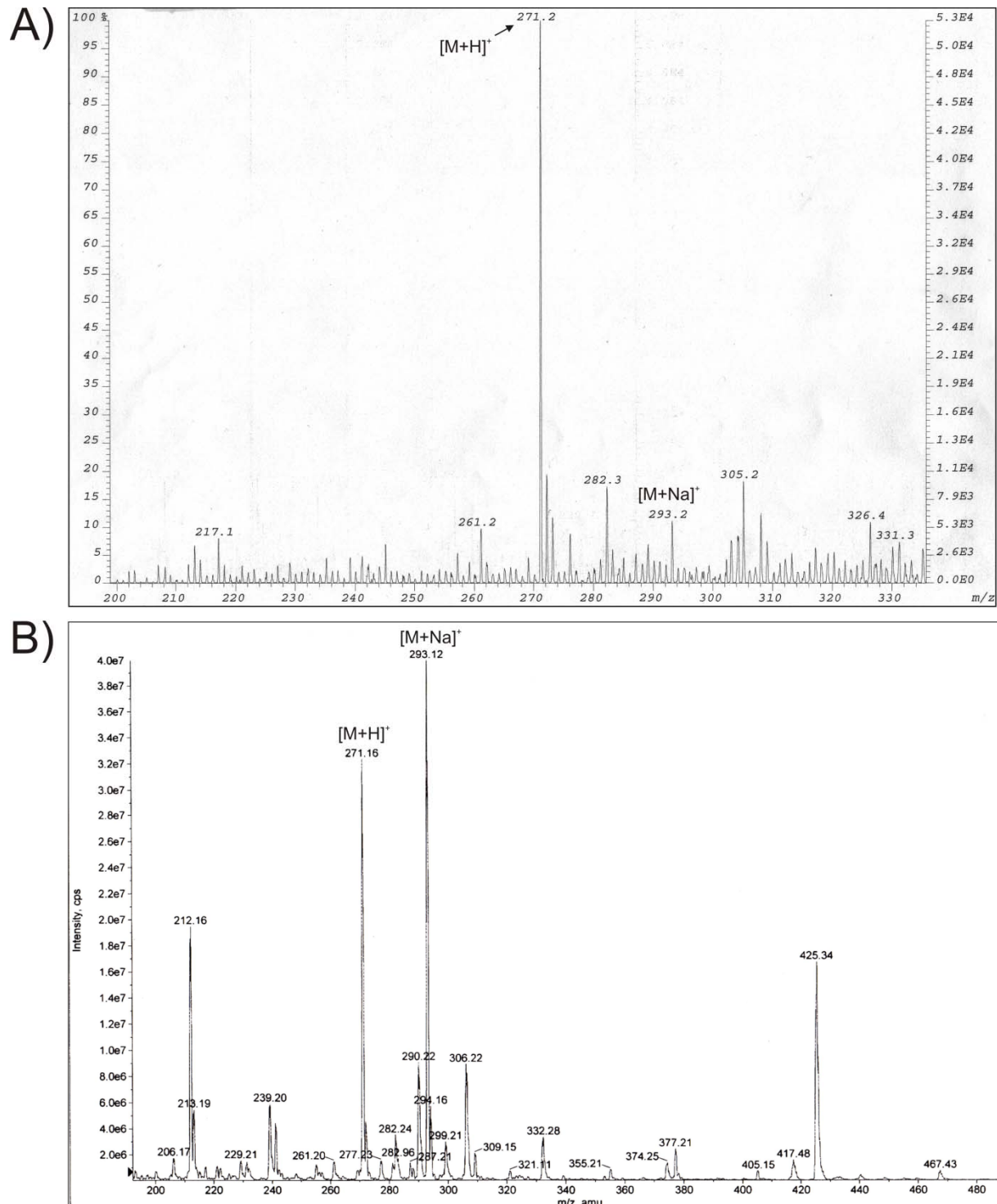


Abbildung 7-4: Das positive ESI-MS-Spektrum von Chanoclavin-I-Aldehyd.

7.2 MS- und NMR-Spektren der isolierten Substanzen aus der FgaOx3-Reaktion



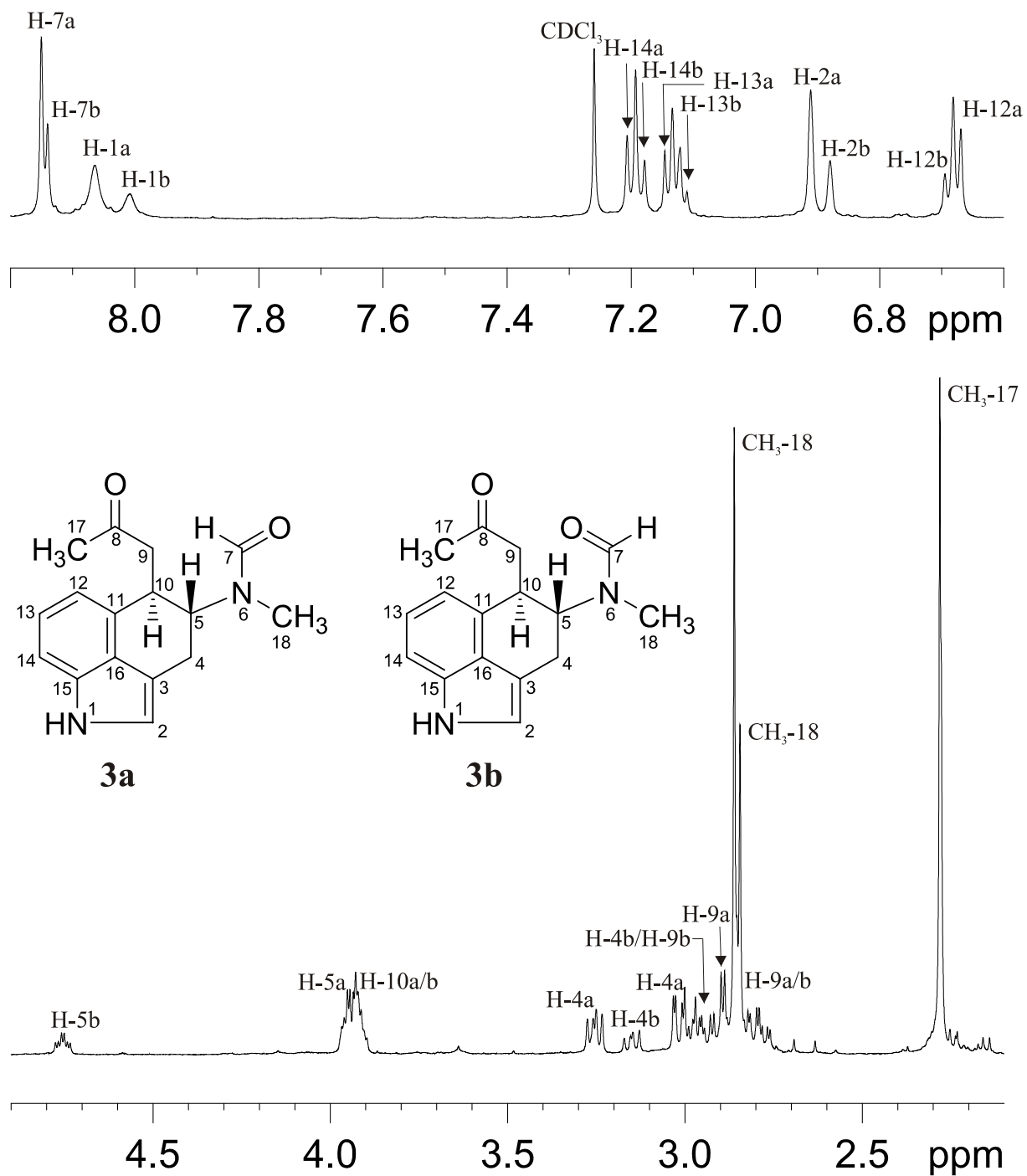


Abbildung 7-6: ^1H -NMR-Spektrum von **3a** und **3b** in CDCl_3 bei 300 K, isoliert aus dem Reaktionsansatz mit FgaDH und FgaOx3. Die Buchstaben a und b hinter den Nummern geben die Zuordnung zu dem entsprechenden Isomer an.

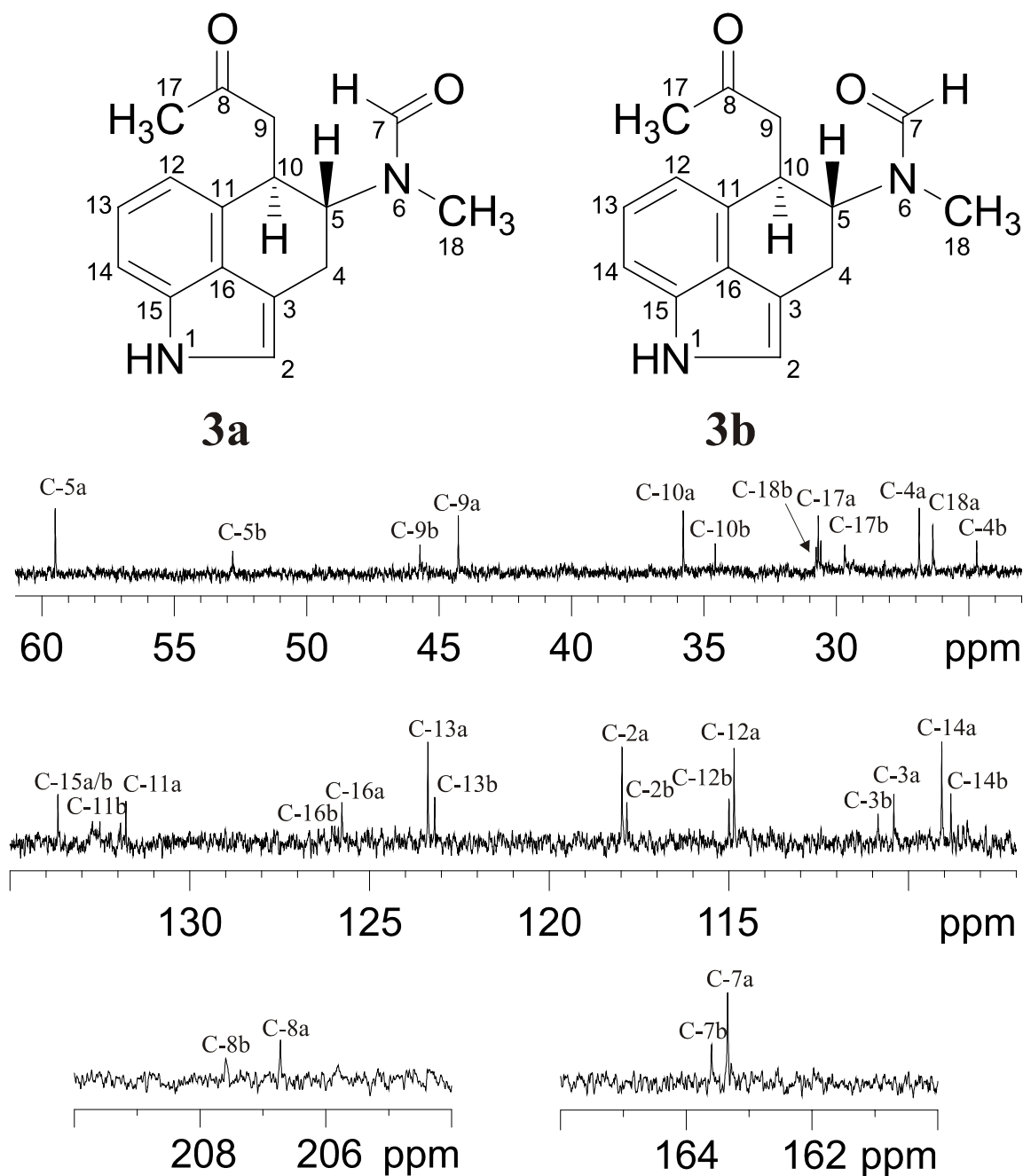


Abbildung 7-7: ^{13}C -NMR-Spektrum von 3a und 3b in CDCl_3 bei 300 K, isoliert aus dem Reaktionsansatz mit FgaDH und FgaOx3. Die Buchstaben a und b hinter den Nummern geben die Zuordnung zu dem entsprechenden Isomer an.

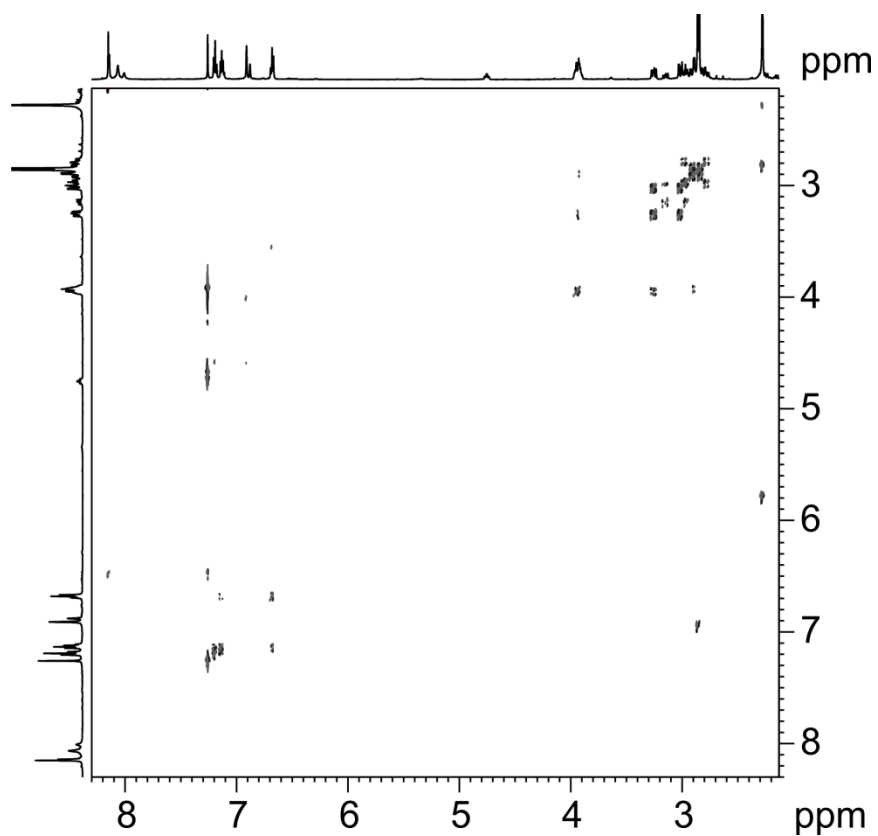


Abbildung 7-8: E-COSY-Spektrum von 3a und 3b in CDCl_3 bei 300 K.

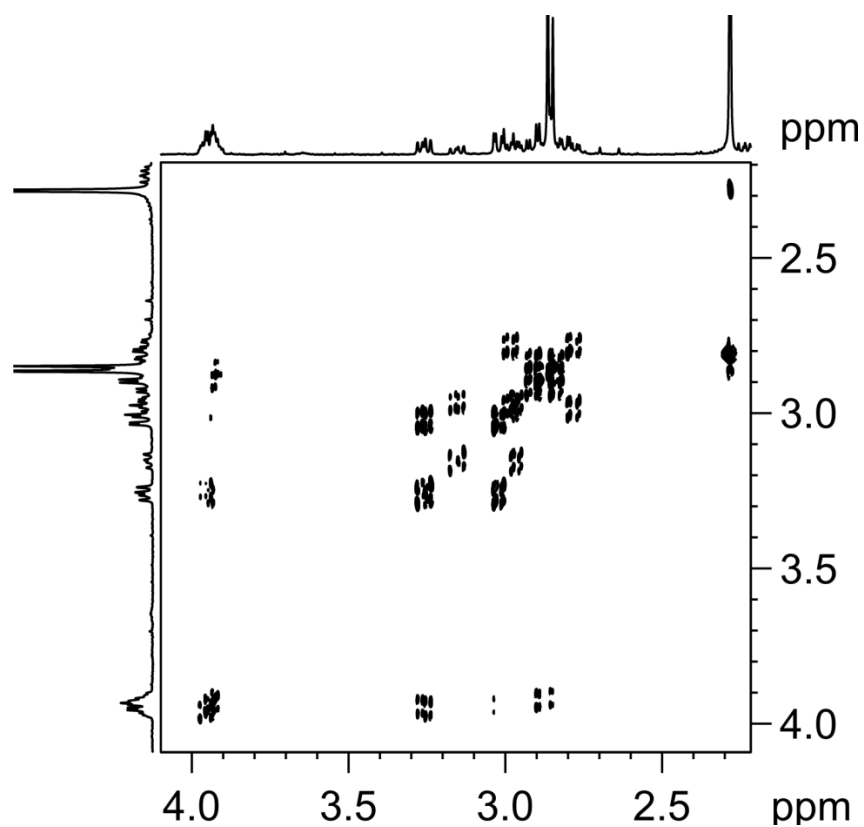


Abbildung 7-9: Vergrößerung des aliphatischen Bereichs des E-COSY-Spektrums von 3a und 3b in CDCl_3 bei 300 K.

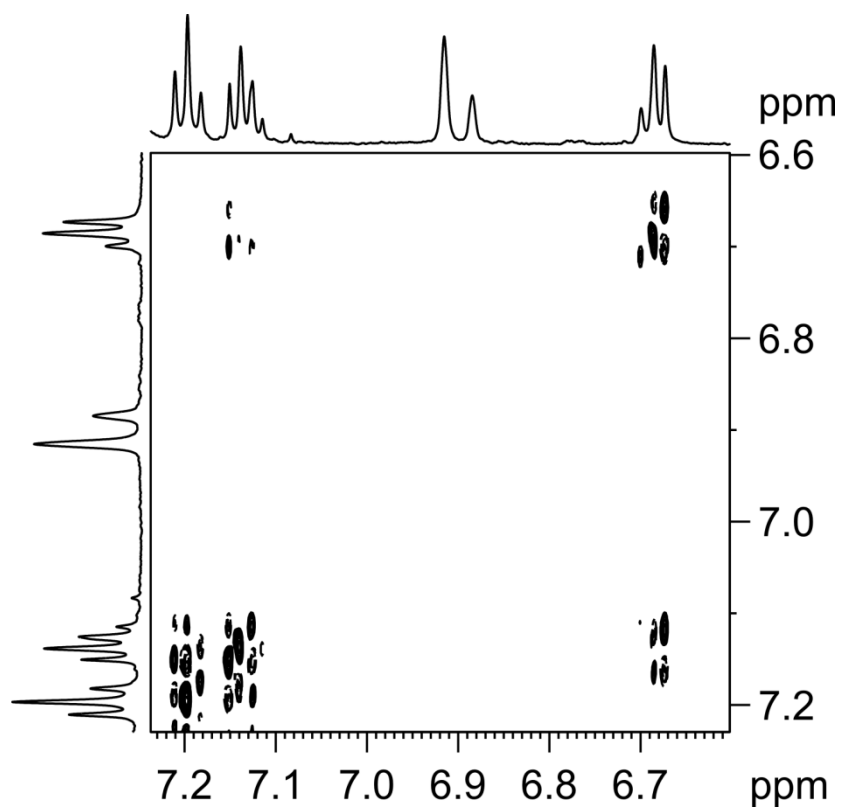


Abbildung 7-10: Vergrößerung des aromatischen Bereichs des E-COSY-Spektrums von 3a und 3b in CDCl₃ bei 300 K.

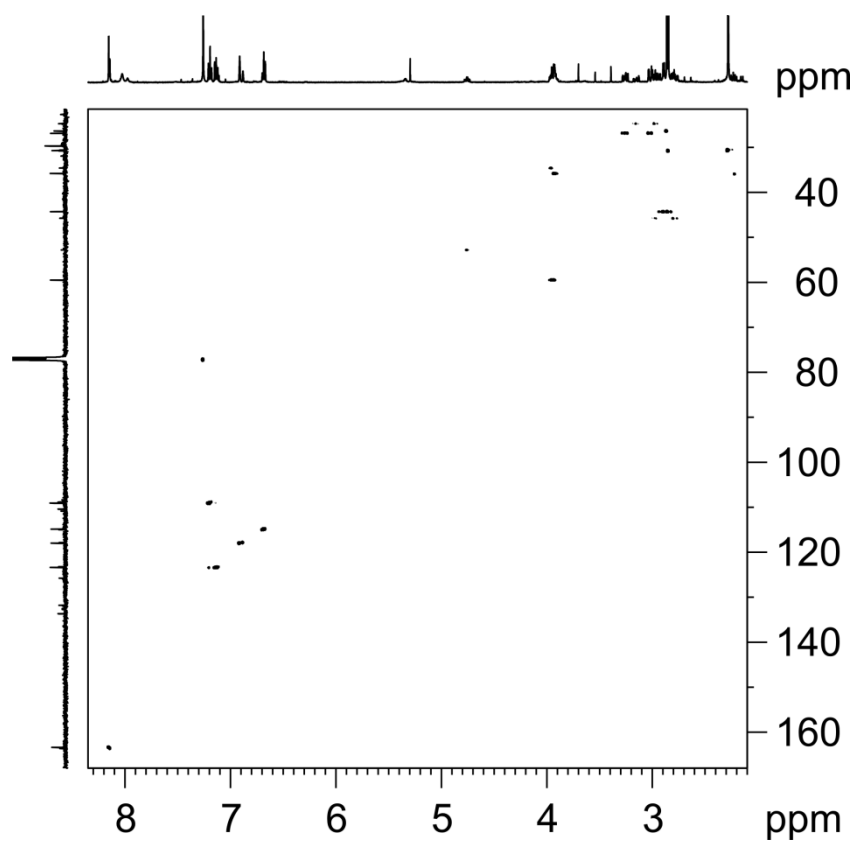


Abbildung 7-11: HSQC-Spektrum von 3a und 3b in CDCl₃ bei 300 K.

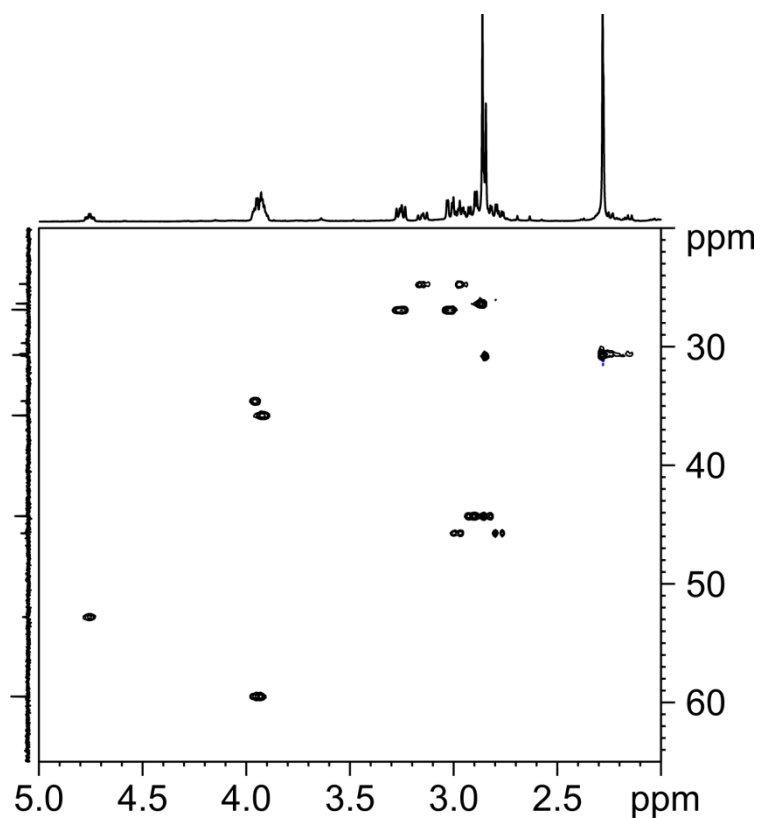


Abbildung 7-12: Vergrößerung des aliphatischen Bereichs des HSQC-Spektrums von 3a und 3b in CDCl_3 bei 300 K.

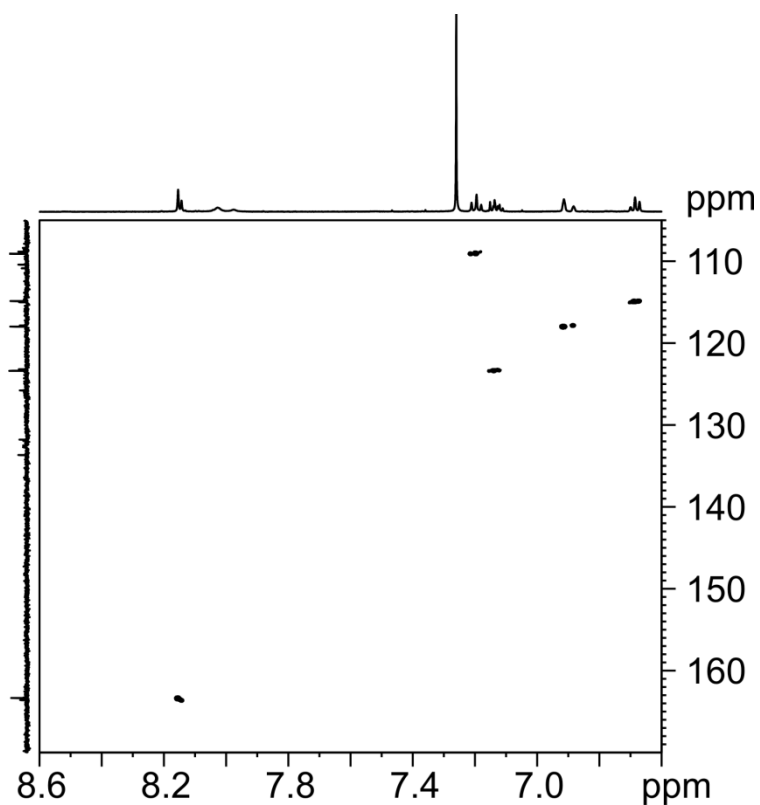


Abbildung 7-13: Vergrößerung des aromatischen Bereichs des HSQC-Spektrums von 3a und 3b in CDCl_3 bei 300 K.

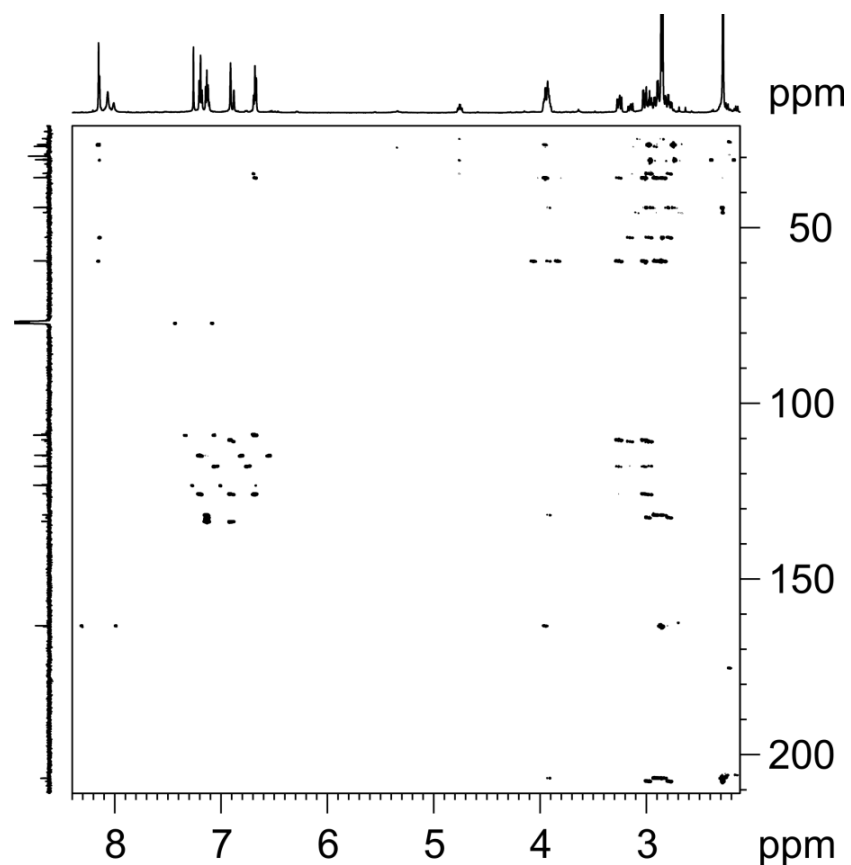


Abbildung 7-14: HMBC-Spektrum von 3a und 3b in CDCl_3 bei 300 K.

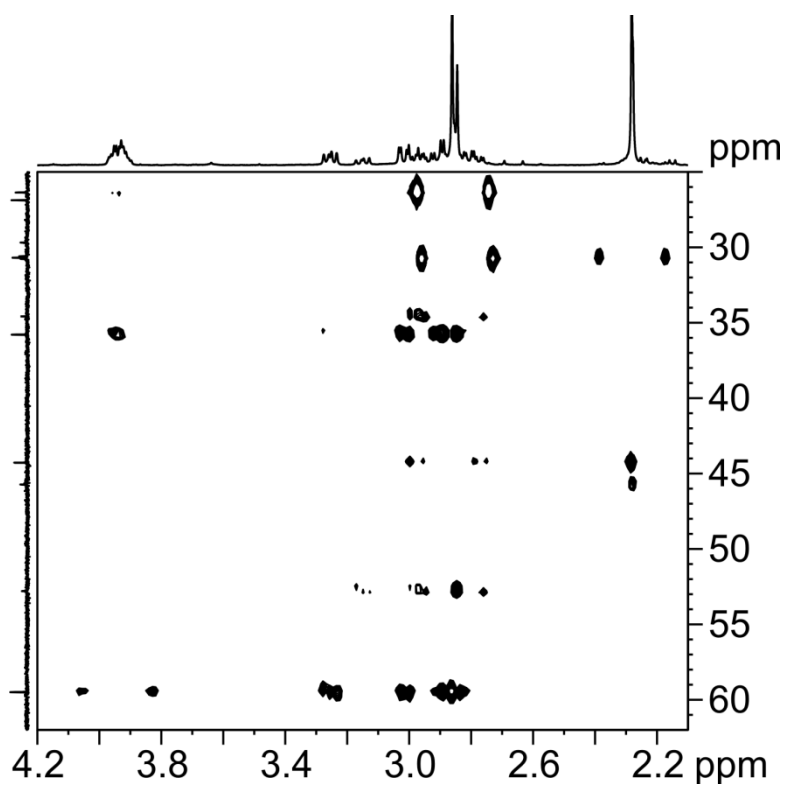


Abbildung 7-15: Vergrößerung des aliphatischen Bereichs des HMBC-Spektrums von 3a und 3b in CDCl_3 bei 300 K.

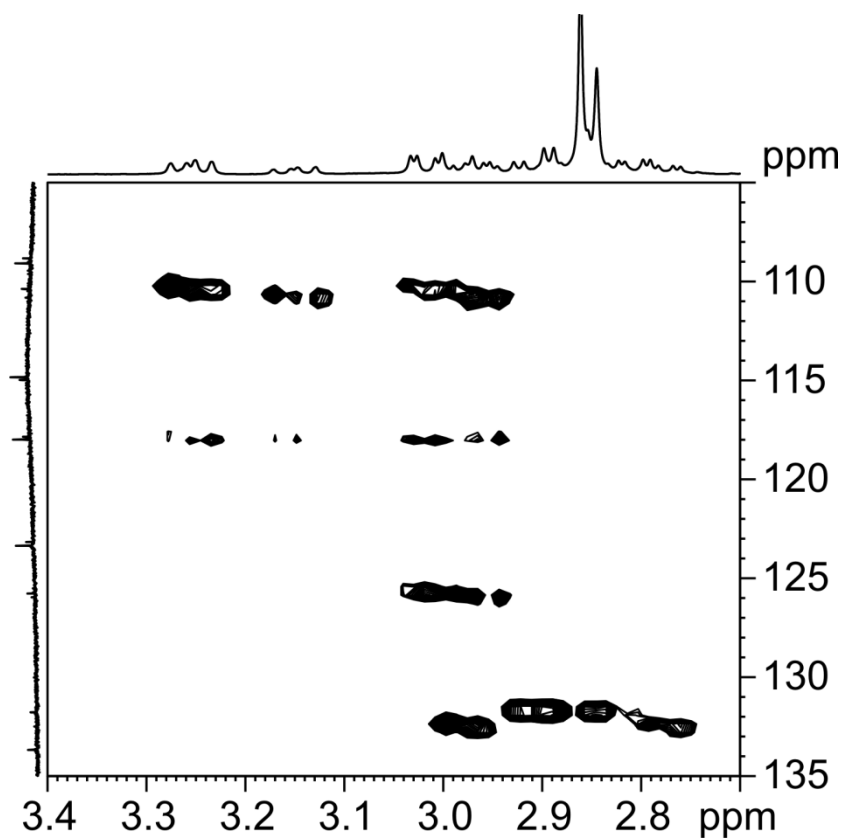


Abbildung 7-16: Vergrößerung des aliphatischen Bereichs des HMBC-Spektrums von 3a und 3b in CDCl_3 bei 300 K.

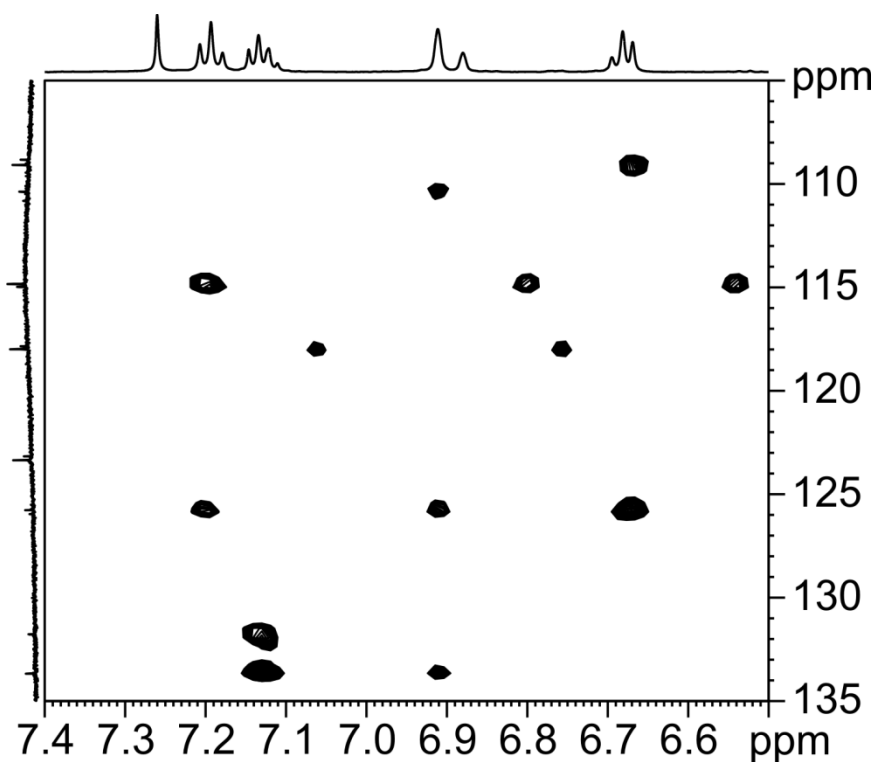


Abbildung 7-17: Vergrößerung des aromatischen Bereichs des HMBC-Spektrums von 3a und 3b in CDCl_3 bei 300 K.

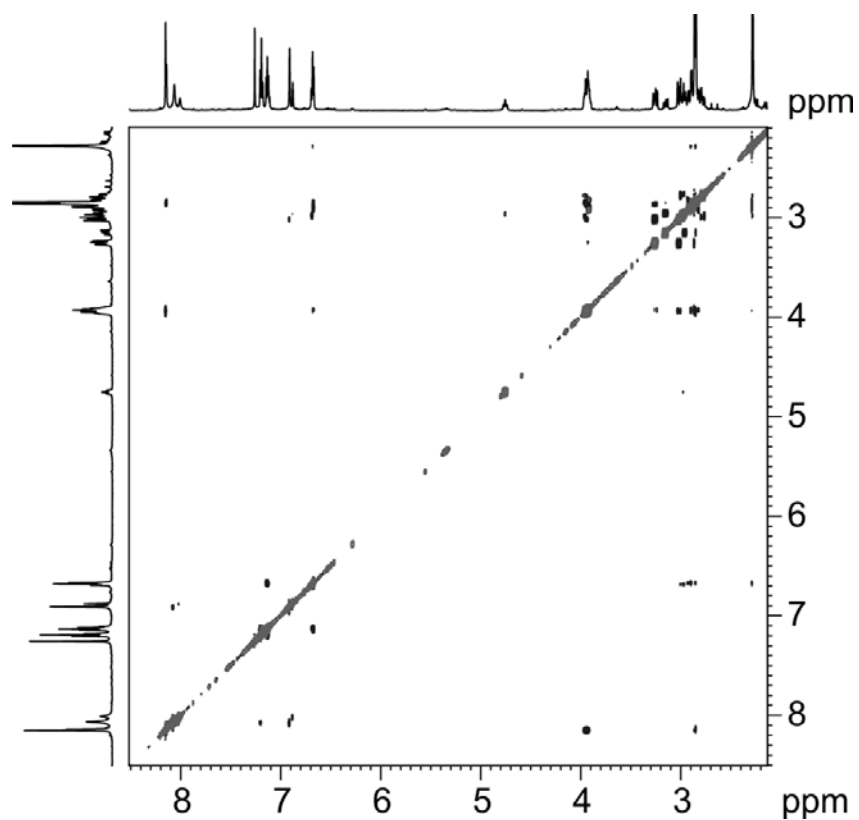


Abbildung 7-18: NOESY-Spektrum von 3a und 3b in CDCl_3 bei 300 K.

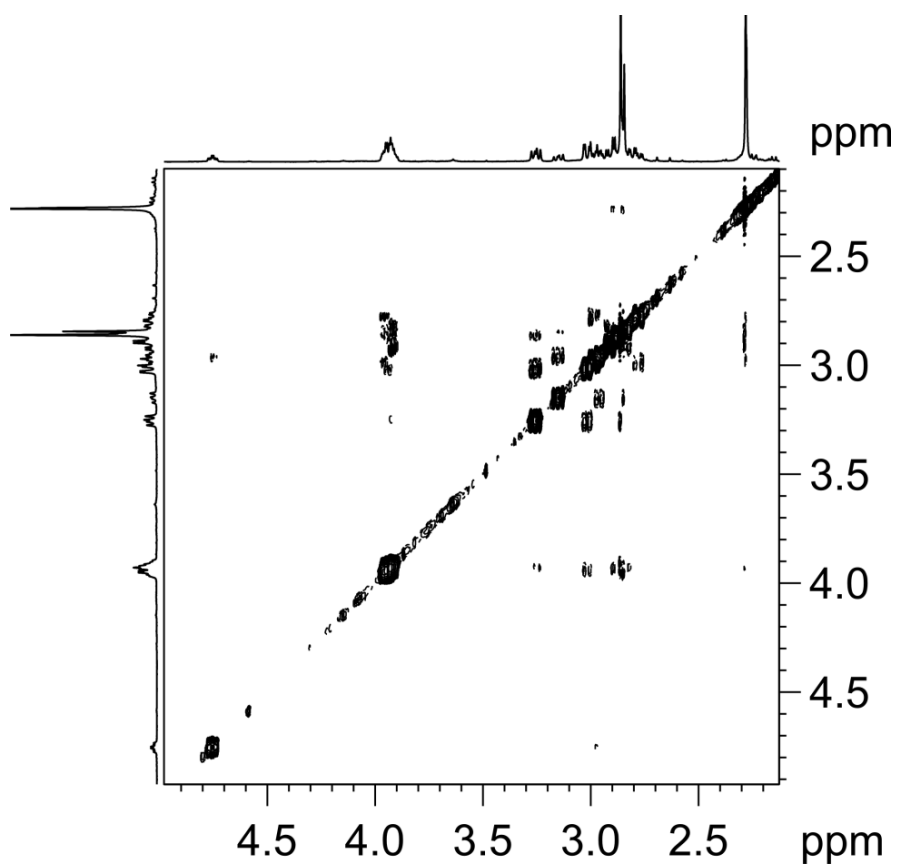


Abbildung 7-19: Vergrößerung des aliphatischen Bereichs des NOESY-Spektrums von 3a und 3b in CDCl_3 bei 300 K.

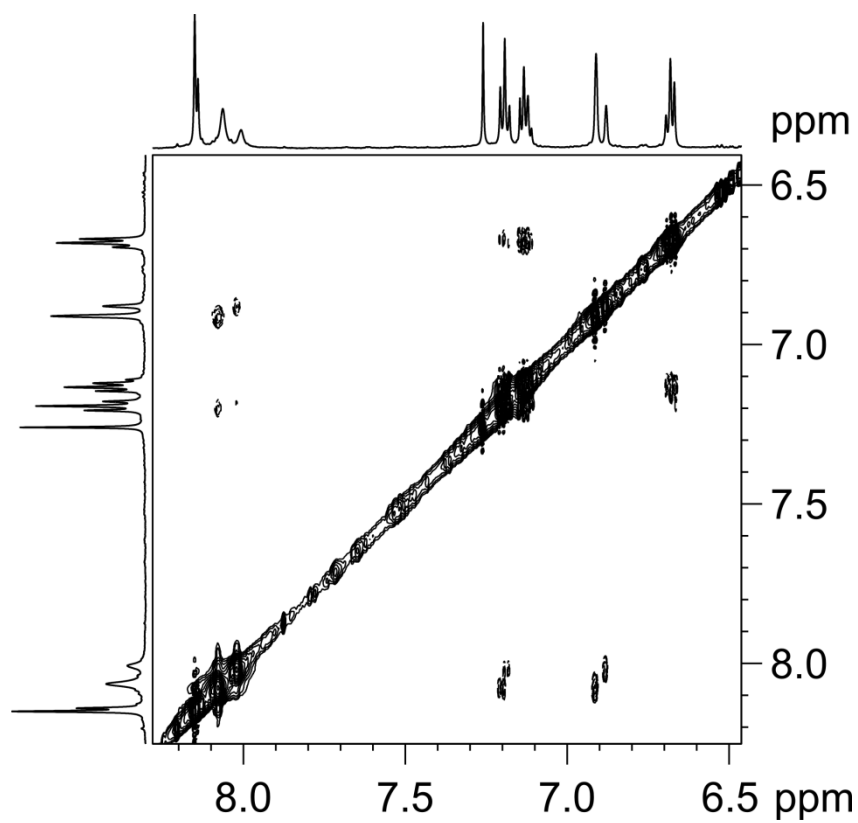


Abbildung 7-20: Vergrößerung des aromatischen Bereichs des NOESY-Spektrums von 3a und 3b in CDCl₃ bei 300 K.

7.3 MS- und NMR-Spektren der isolierten Substanz aus der FgaFS-Reaktion

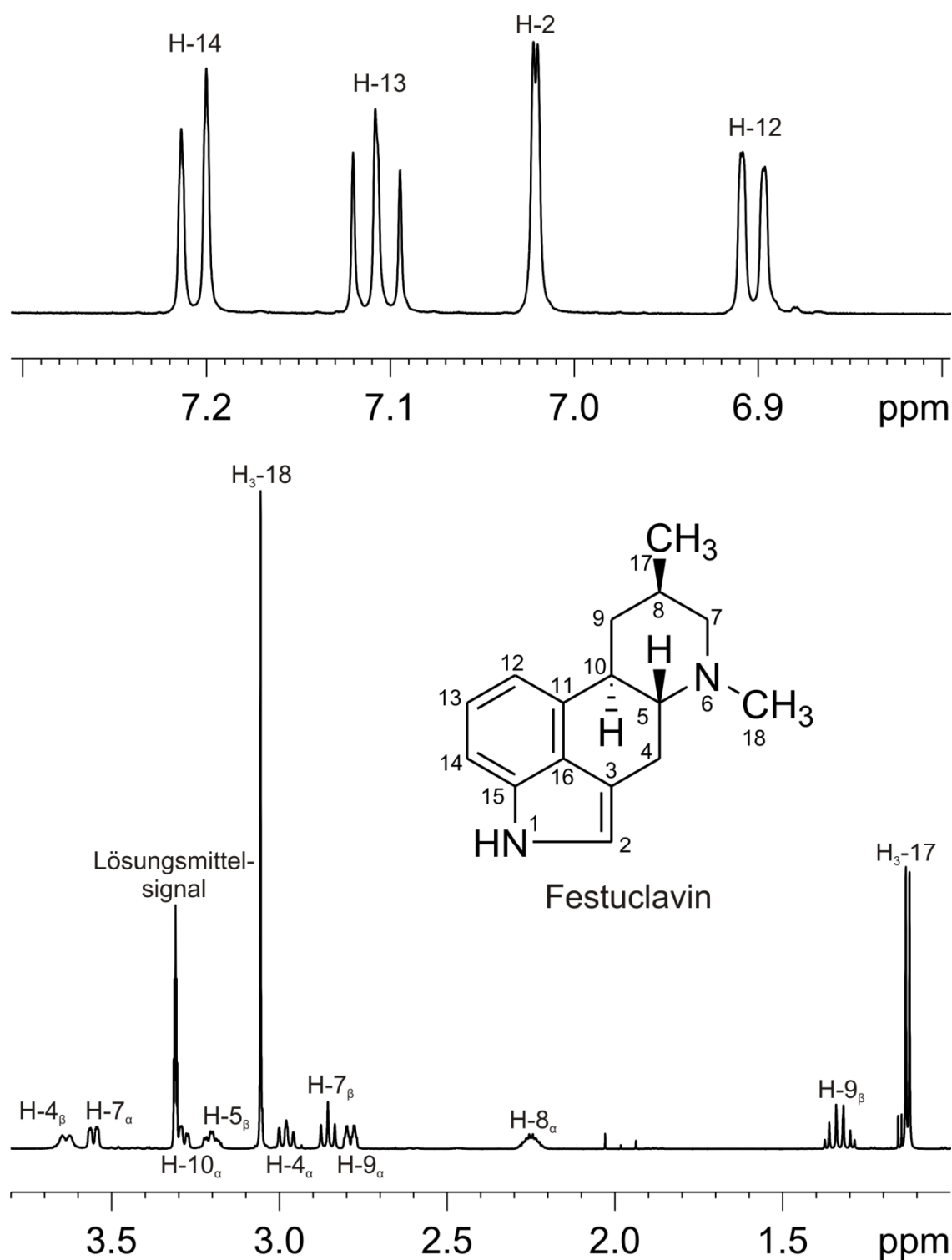


Abbildung 7-21: ^1H -NMR-Spektrum von Festuclavin in protonierter Form in CD_3OD , isoliert aus dem Reaktionsansatz mit FgaDH, FgaOx3 und FgaFS.

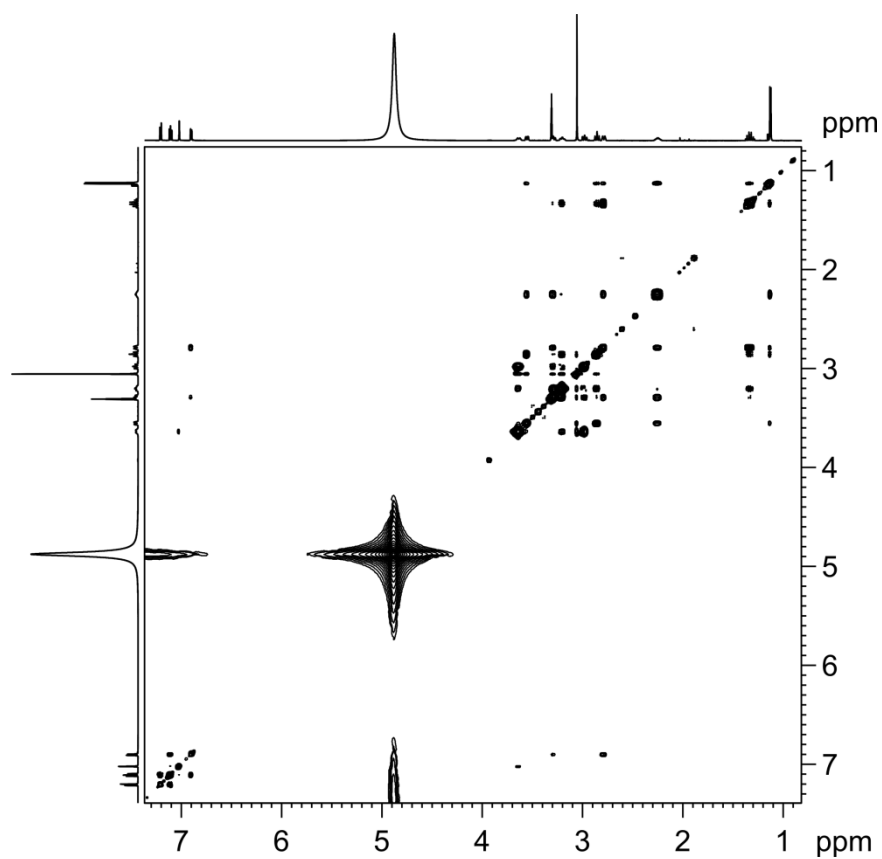


Abbildung 7-22: NOESY-Spektrum von Festuclavin in protonierter Form in CD₃OD.

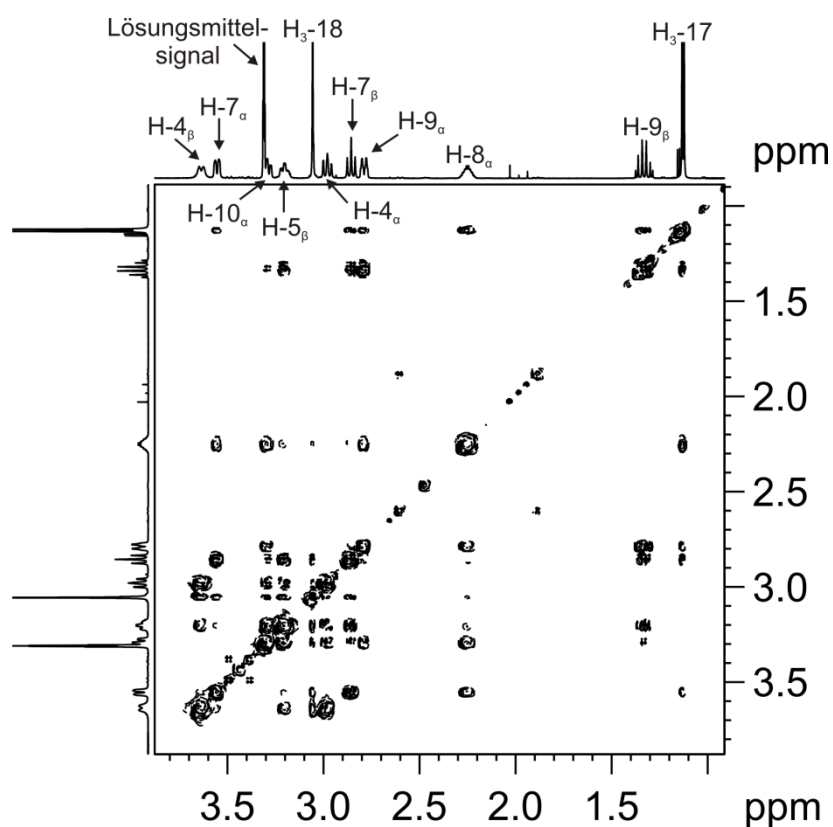


Abbildung 7-23: Vergrößerung des aliphatischen Bereichs des NOESY-Spektrums von Festuclavin in protonierter Form in CD₃OD.

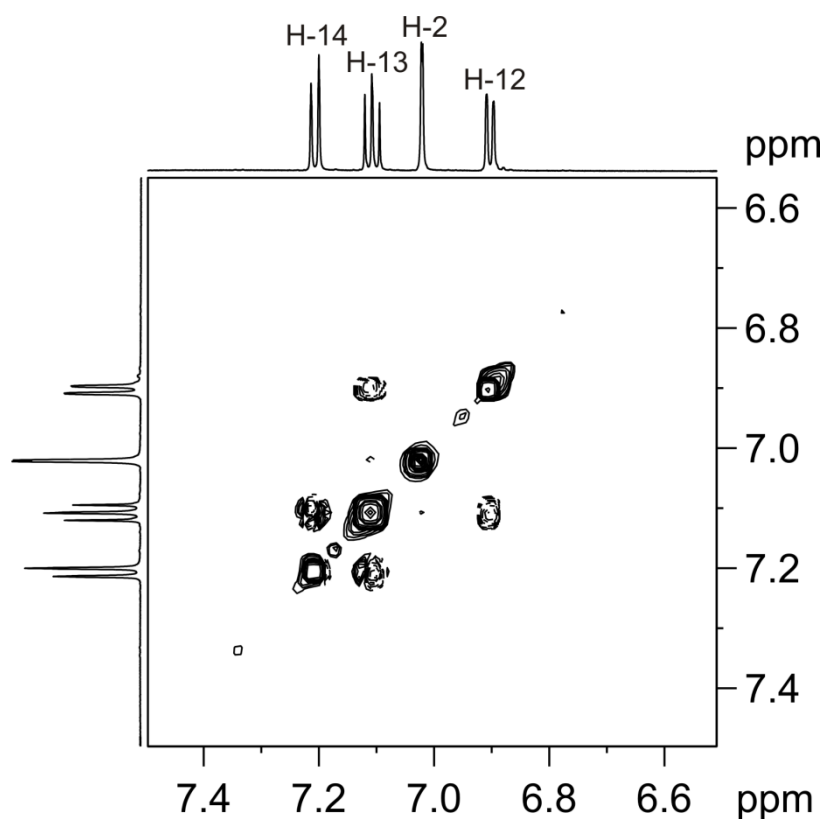


Abbildung 7-24: Vergrößerung des aromatischen Bereichs des NOESY-Spektrums von Festuclavin in protonierter Form in CD₃OD.

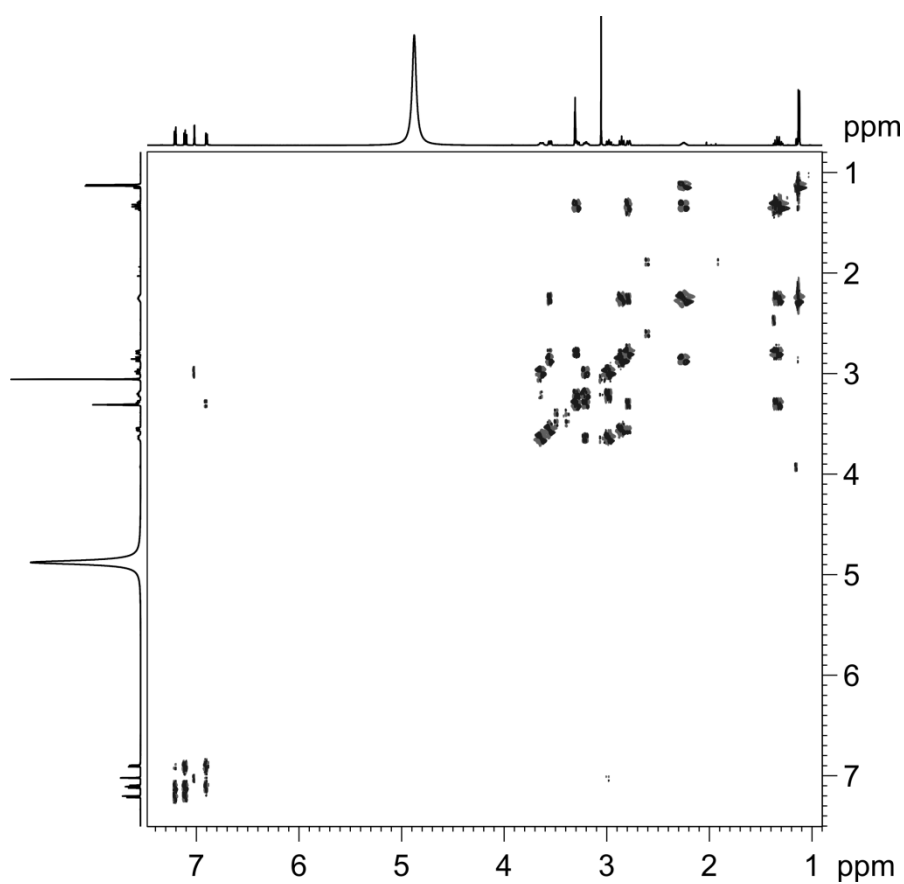


Abbildung 7-25: COSY-Spektrum von Festuclavin in protonierter Form in CD₃OD.

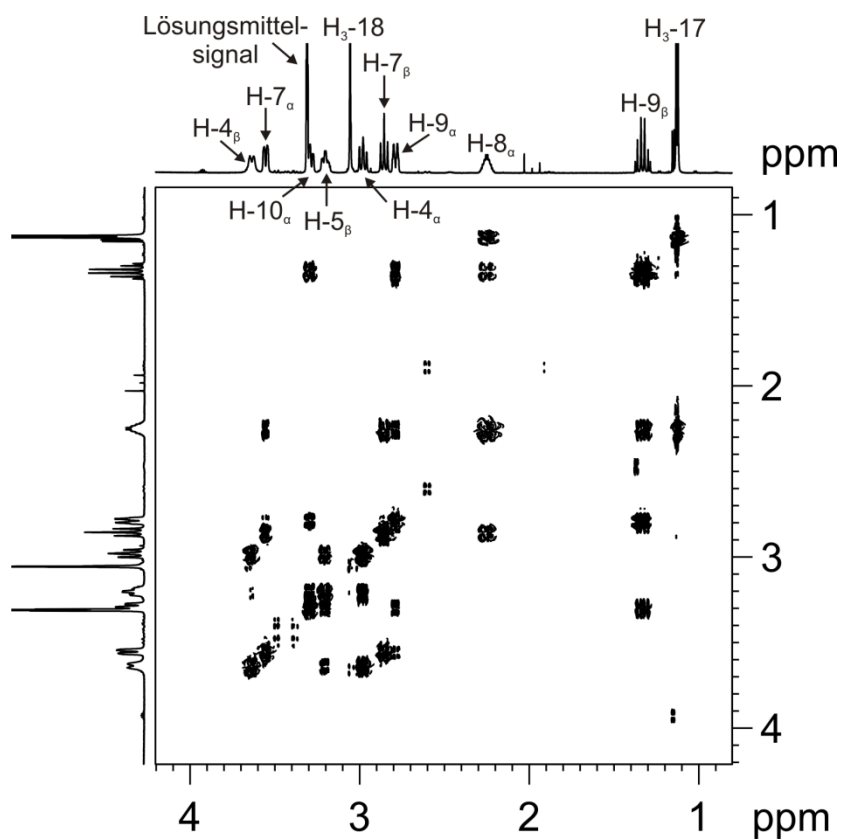


Abbildung 7-26: Vergrößerung des aliphatischen Bereichs des COSY-Spektrums von Festuclavin in protonierter Form in CD₃OD.

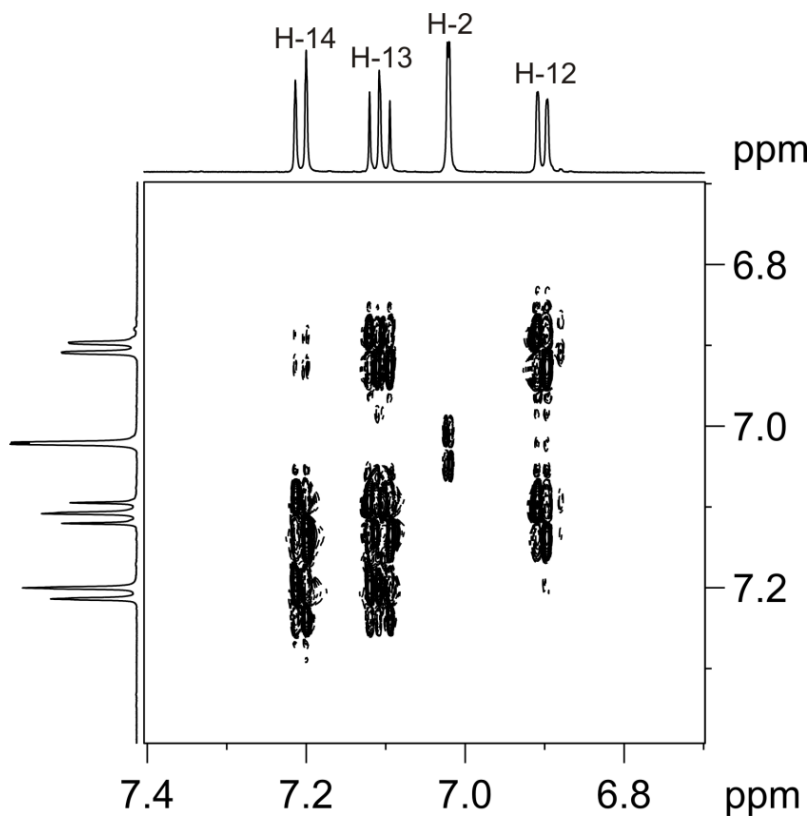


Abbildung 7-27: Vergrößerung des aromatischen Bereichs des COSY-Spektrums von Festuclavin in protonierter Form in CD₃OD.

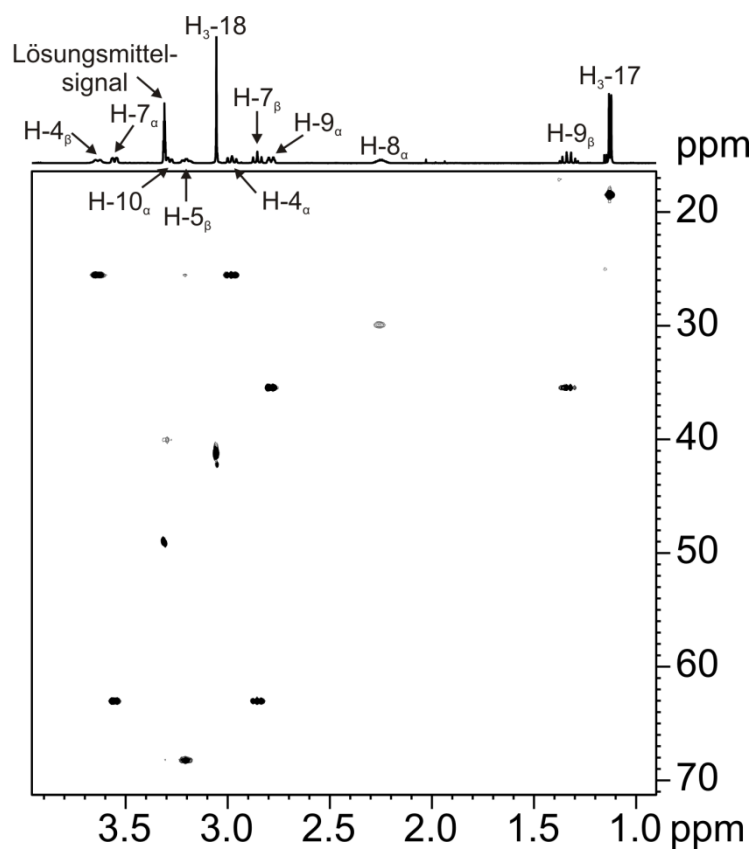


Abbildung 7-28: Vergrößerung des aliphatischen Bereichs des HSQC-Spektrums von Festuclavin in protonierter Form in CD₃OD.

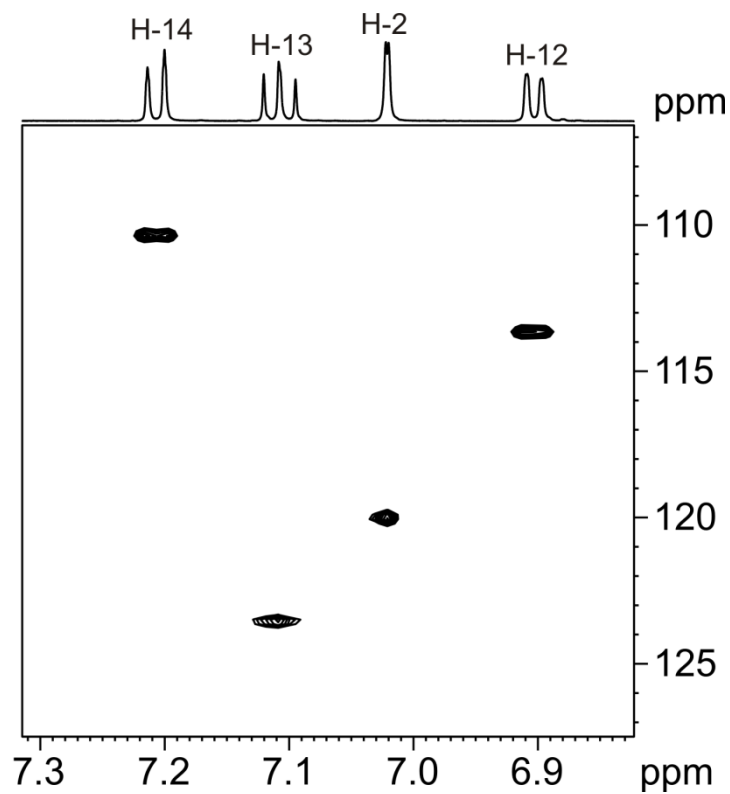


Abbildung 7-29: Vergrößerung des aromatischen Bereichs des HSQC-Spektrums von Festuclavin in protonierter Form in CD₃OD.

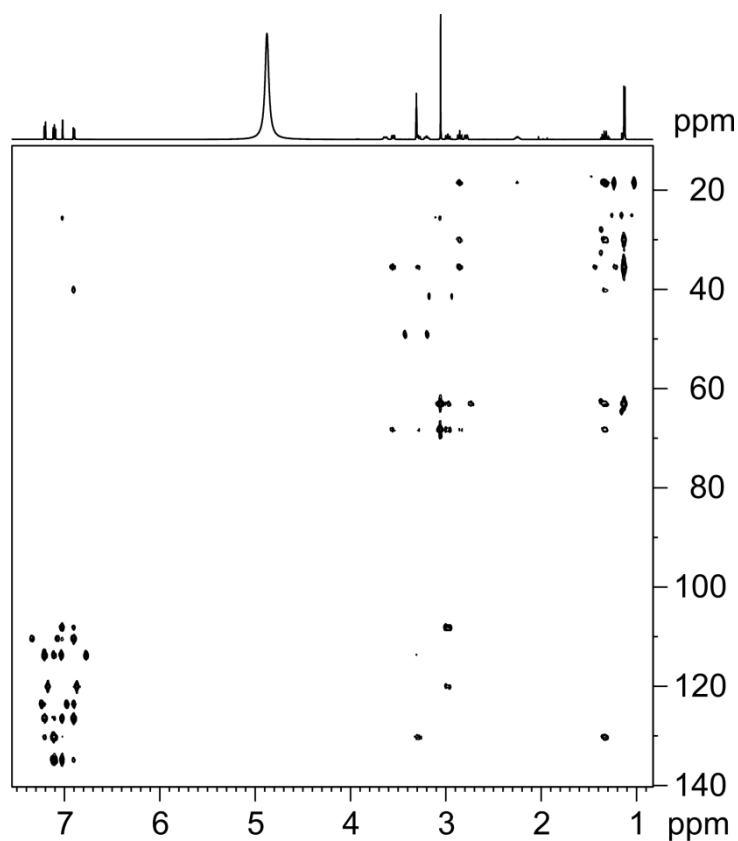


Abbildung 7-30: HMBC-Spektrum von Festuclavin in protonierter Form in CD₃OD.

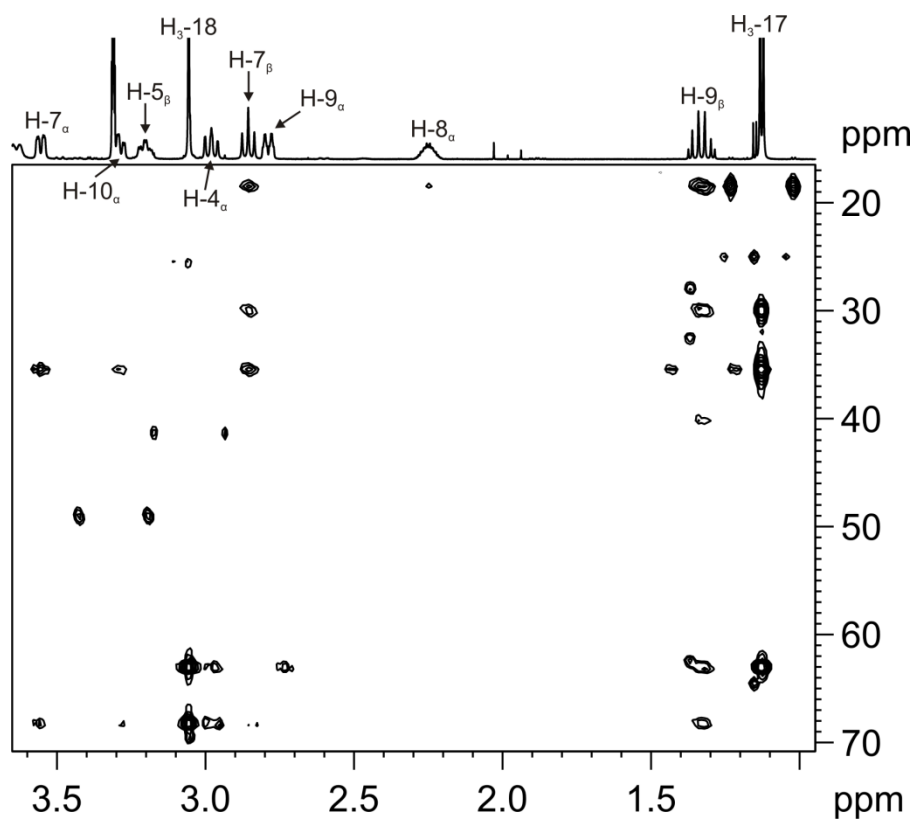


Abbildung 7-31: Vergrößerung des aliphatischen Bereichs des HMBC-Spektrums von Festuclavin in protonierter Form in CD₃OD.

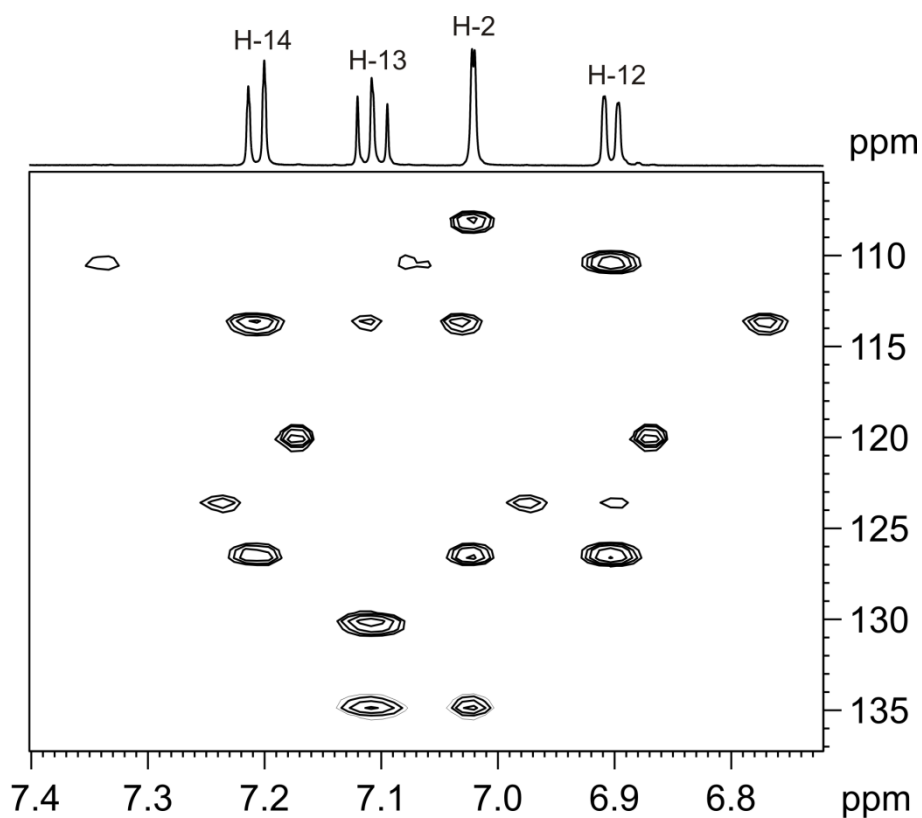


Abbildung 7-32: Vergrößerung des aromatischen Bereichs des HMBC-Spektrums von Festuclavin in protonierter Form in CD_3OD .

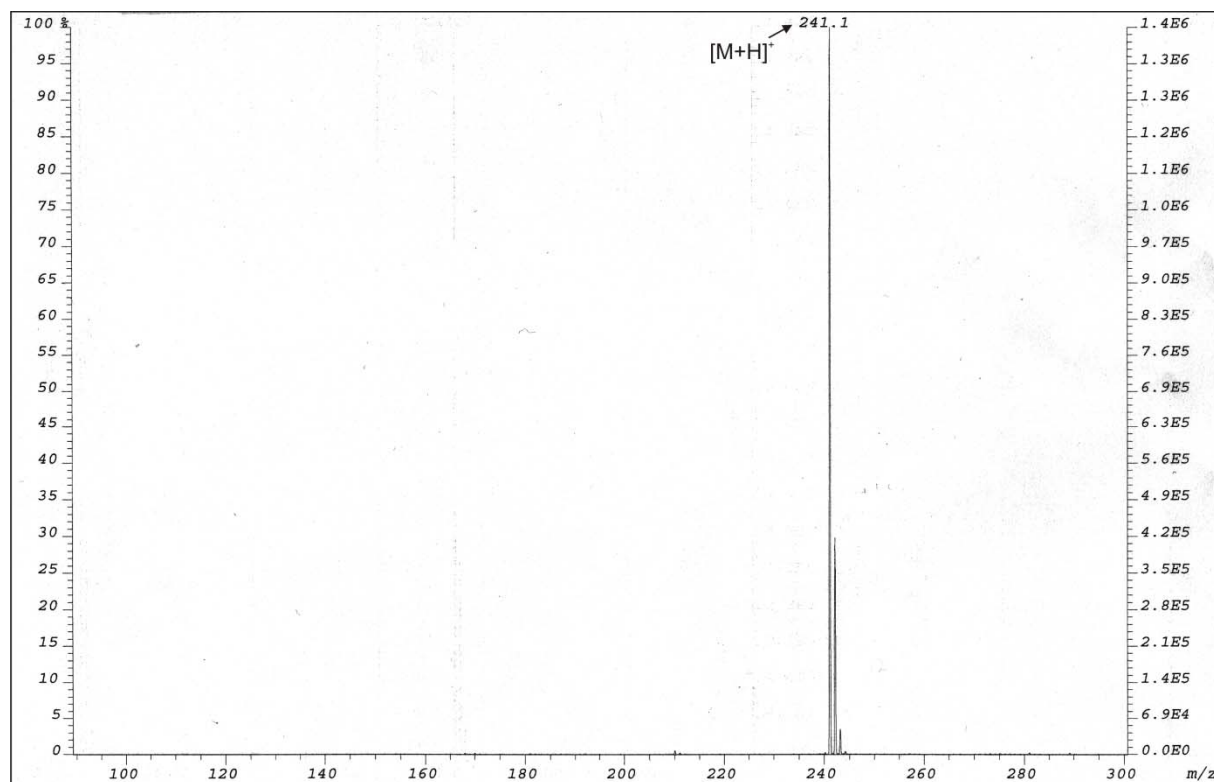


Abbildung 7-33: Positives ESI-MS-Spektrum von Festuclavin.

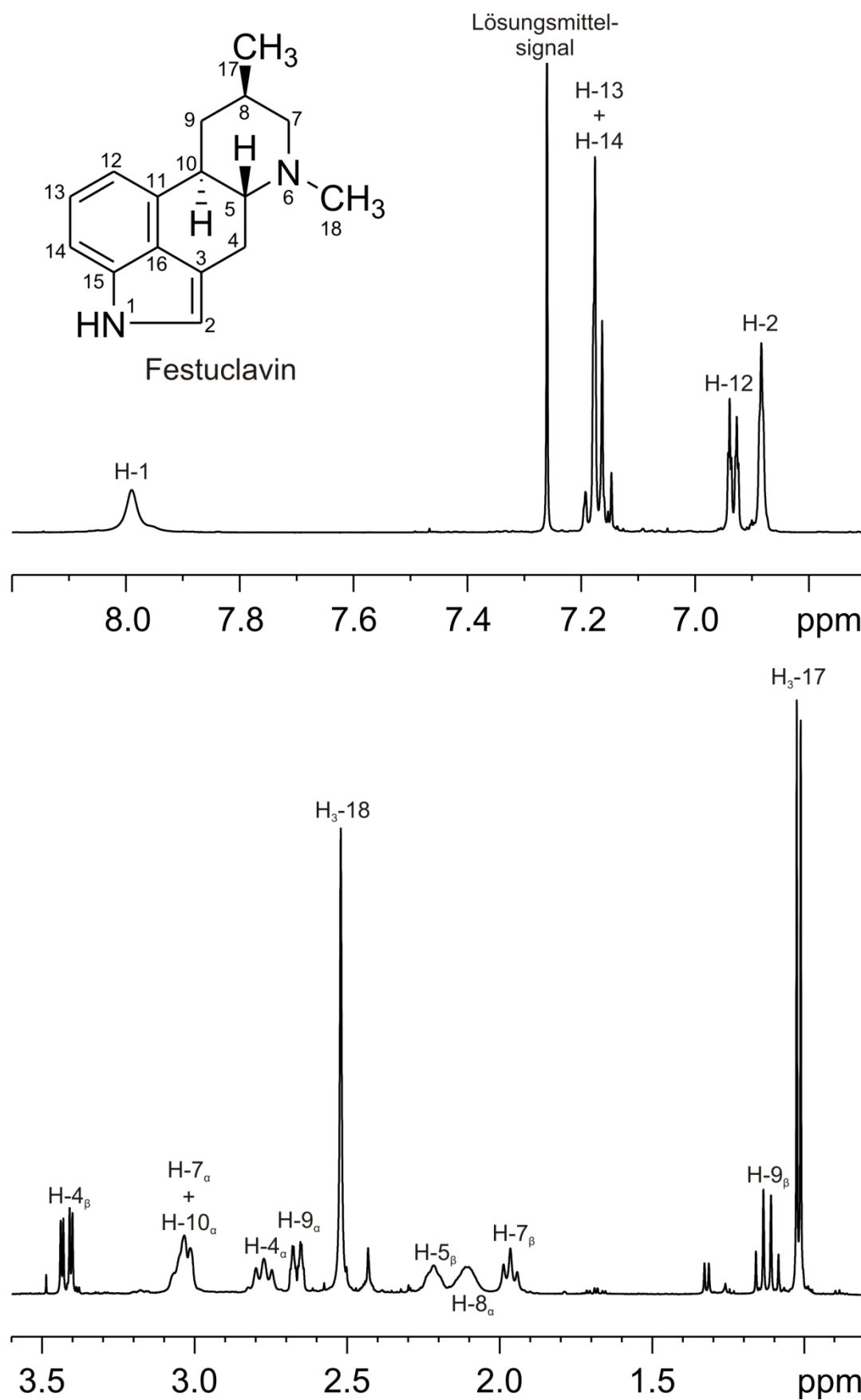


Abbildung 7-34: ^1H -NMR-Spektrum des Festuclavin-Standards von Prof. Leistner als freie Base in CDCl_3 .

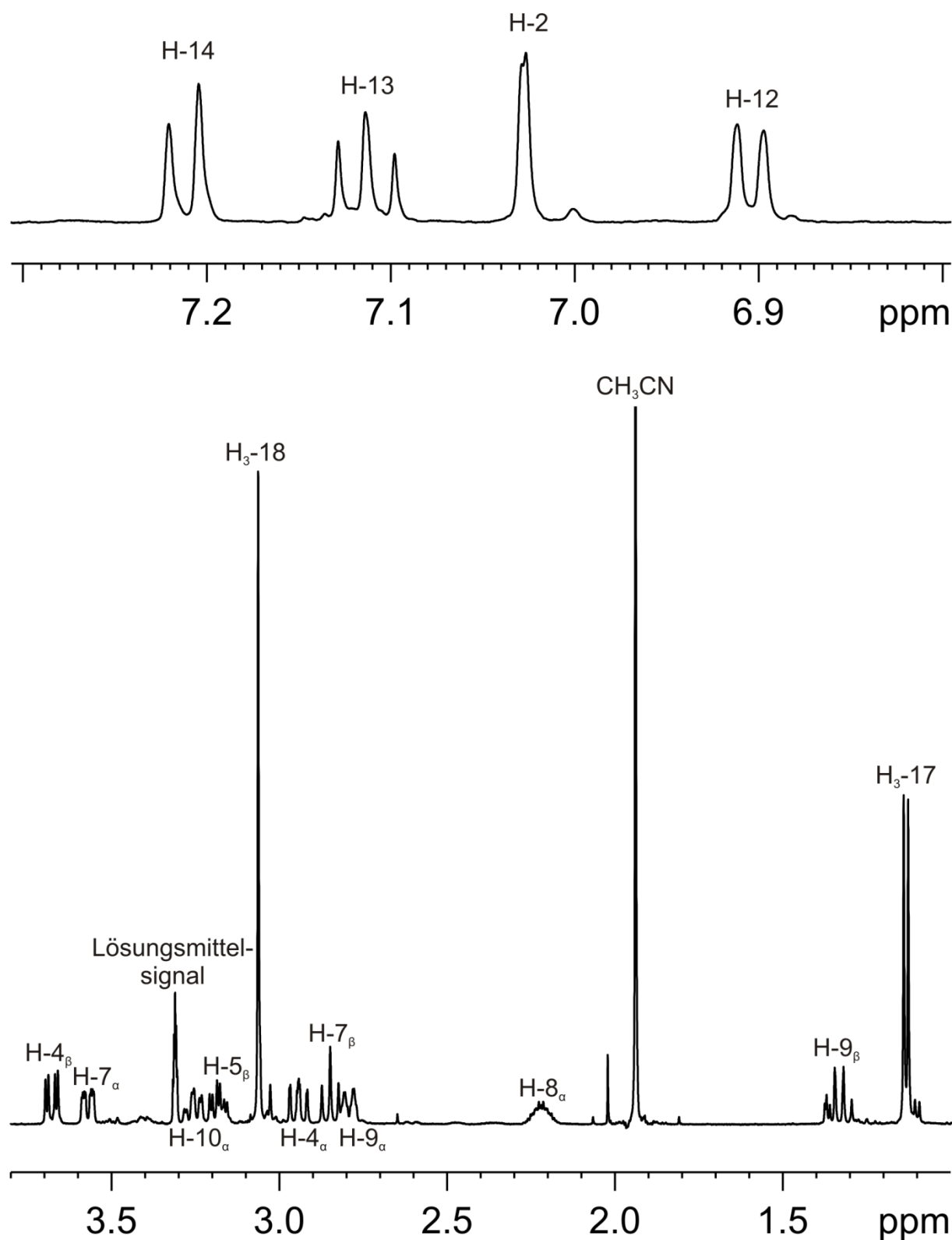
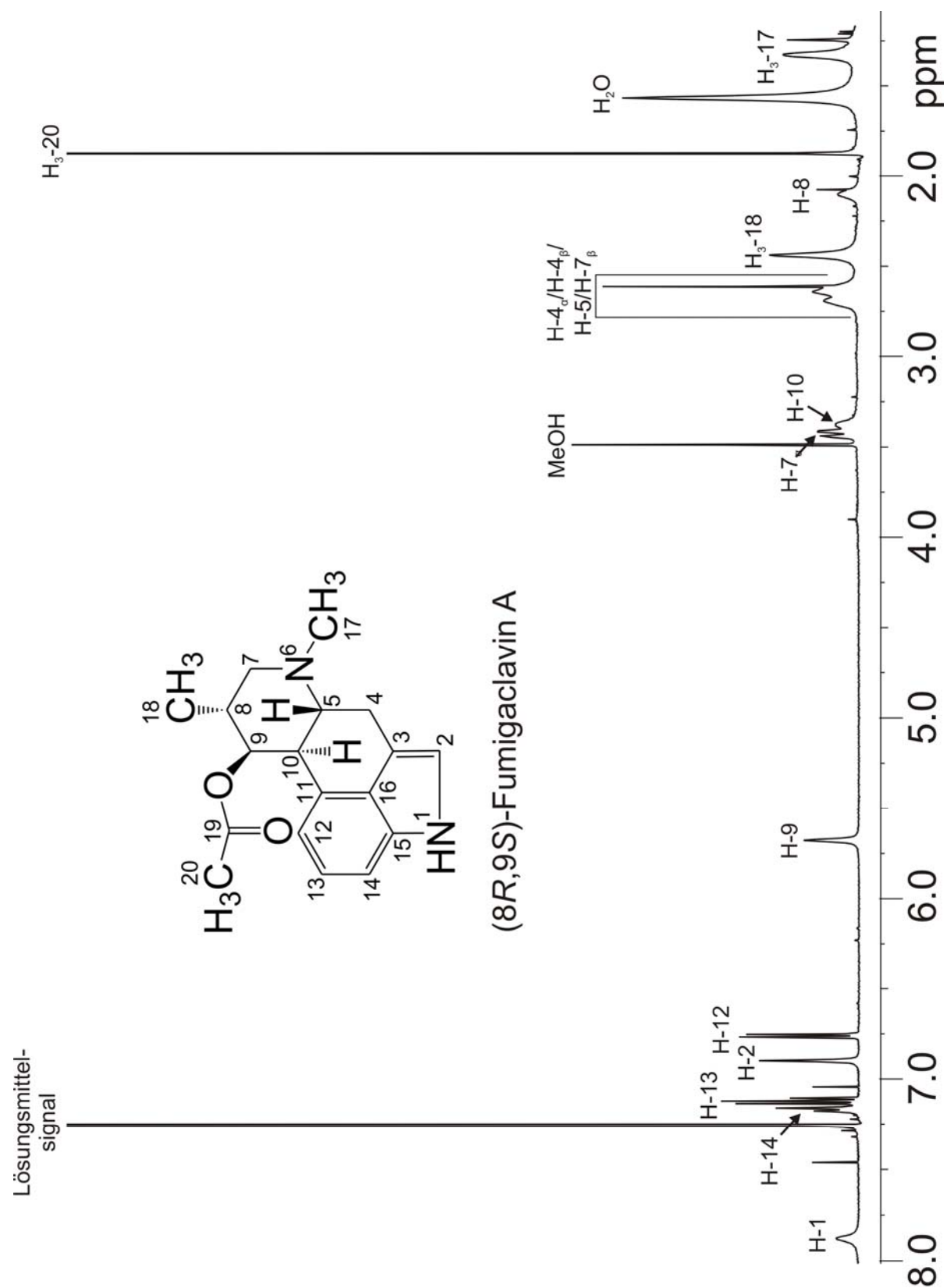


Abbildung 7-35: ^1H -NMR-Spektrum des Festuclavin-Standards von Prof. Leistner in protonierter Form in CD_3OD . Die einrotierte Probe des Festuclavin-Standards als freie Base wurde dafür in HPLC-Lösungsmitteln mit 0,5 % TFA gelöst, einrotiert und in CD_3OD gelöst.

7.4 ^1H -NMR-Spektrum von dem isolierten (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin AAbbildung 7-36: ^1H -NMR-Spektrum von dem isolierten (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A in CDCl_3 .

7.5 MS- und NMR-Spektren der isolierten Substanzen aus der ChaDH-Reaktion

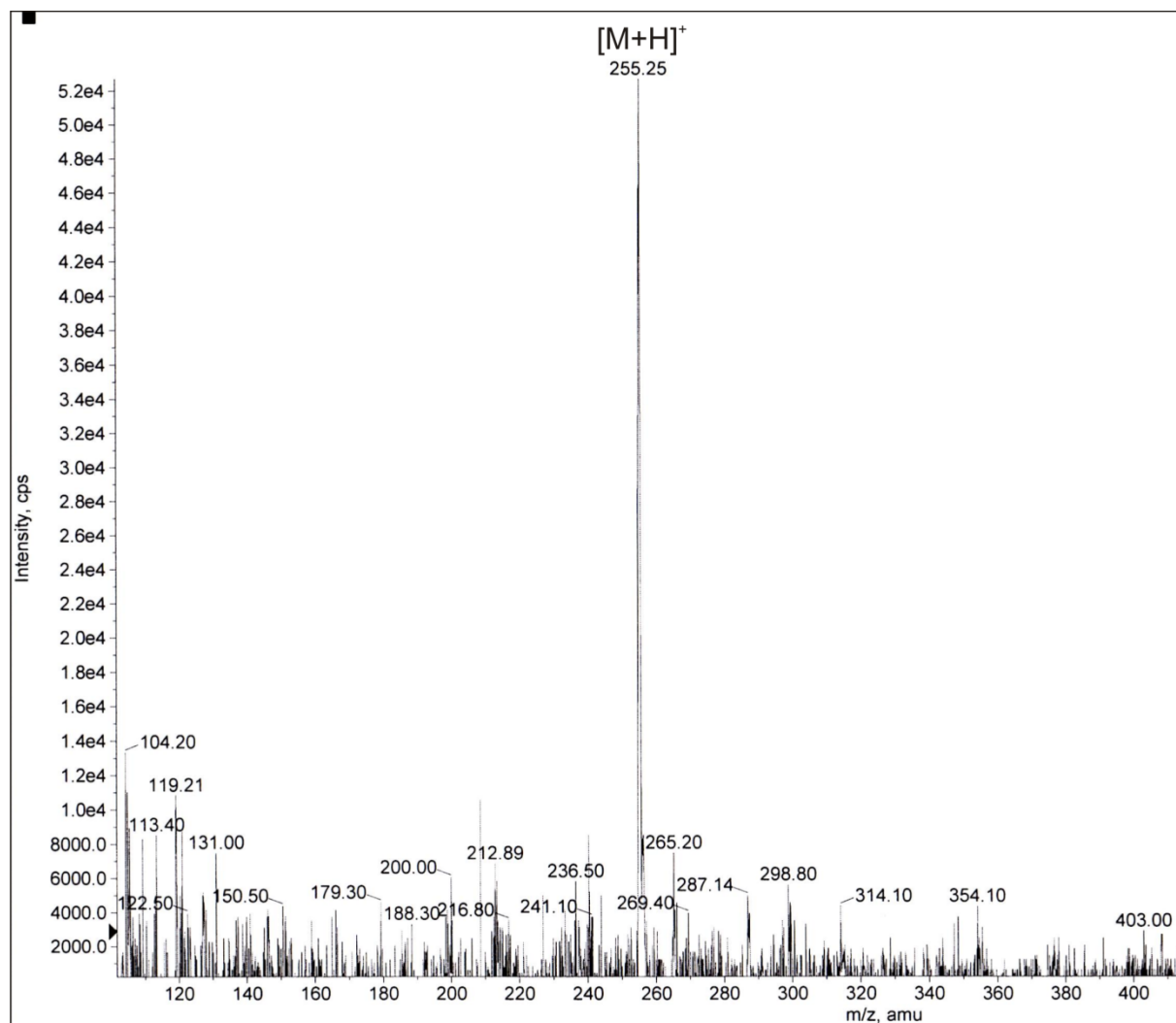


Abbildung 7-37: Das positive ESI-MS-Spektrum von Chanoclavin-I-Aldehyd.

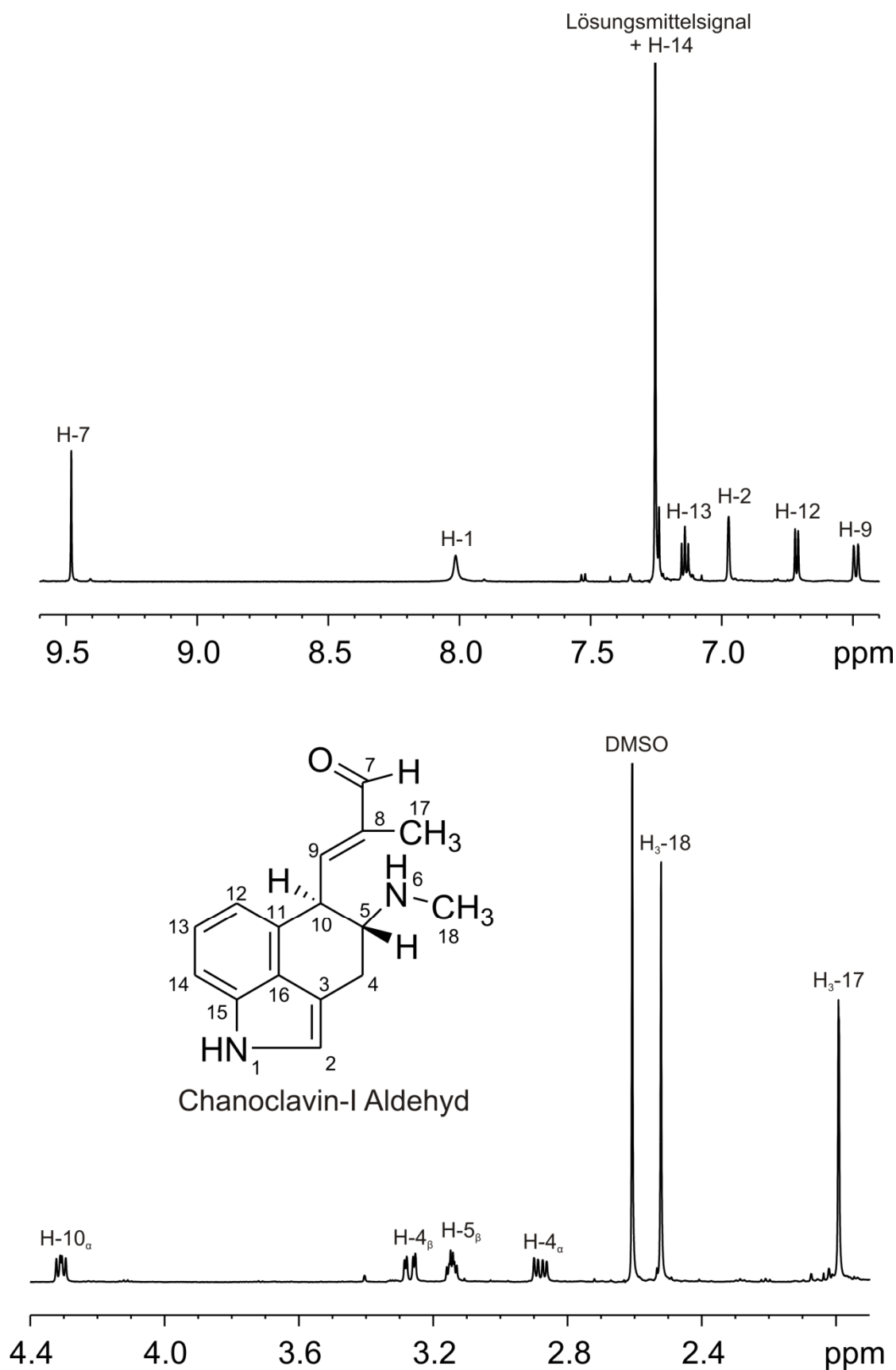


Abbildung 7-38: ¹H-NMR-Spektrum von Chanoclavin-I-Aldehyd in CDCl₃, isoliert aus dem Reaktionsansatz mit ChaDH und deprotoniert mit Natriumcarbonat.

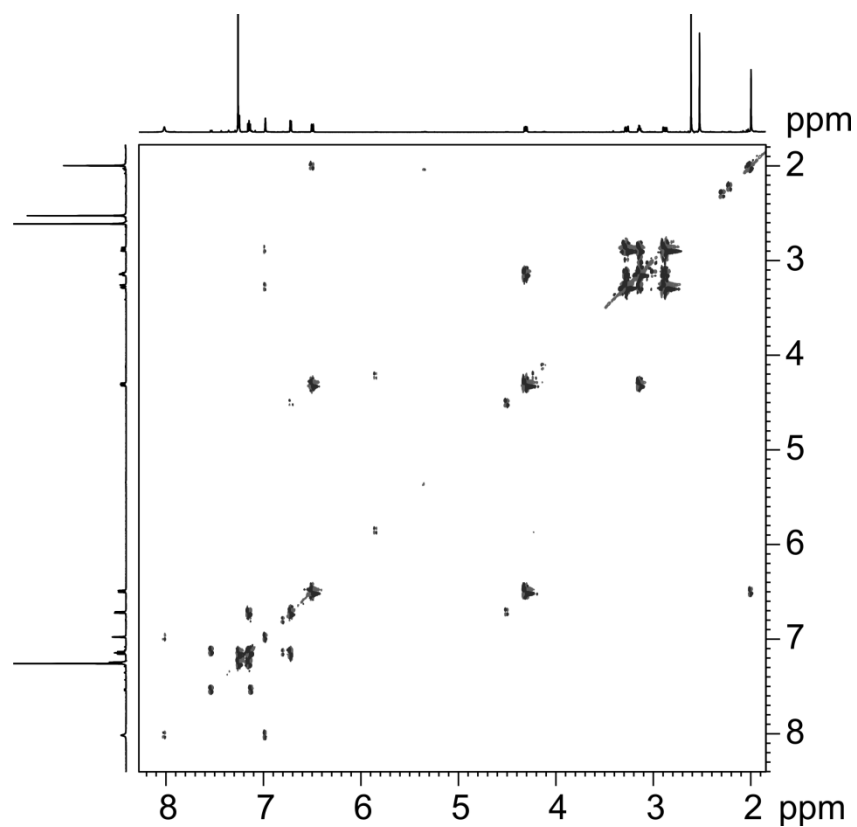


Abbildung 7-39: DQF-COSY-Spektrum von Chanoclavin-I-Aldehyd in CDCl₃.

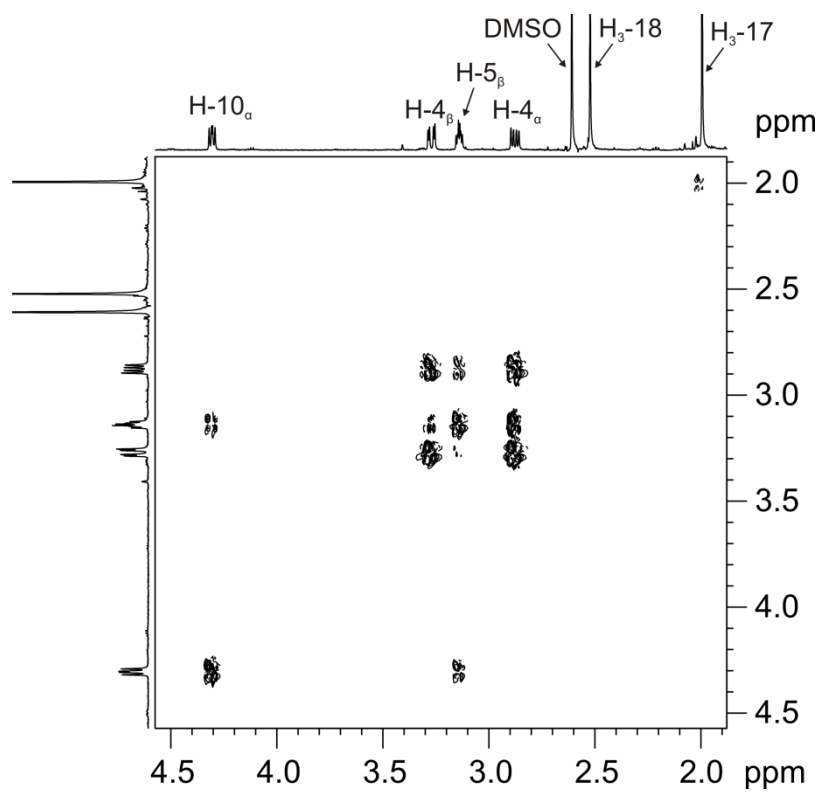


Abbildung 7-40: Vergrößerung des aliphatischen Bereichs des DQF-COSY-Spektrums von Chanoclavin-I-Aldehyd in CDCl₃.

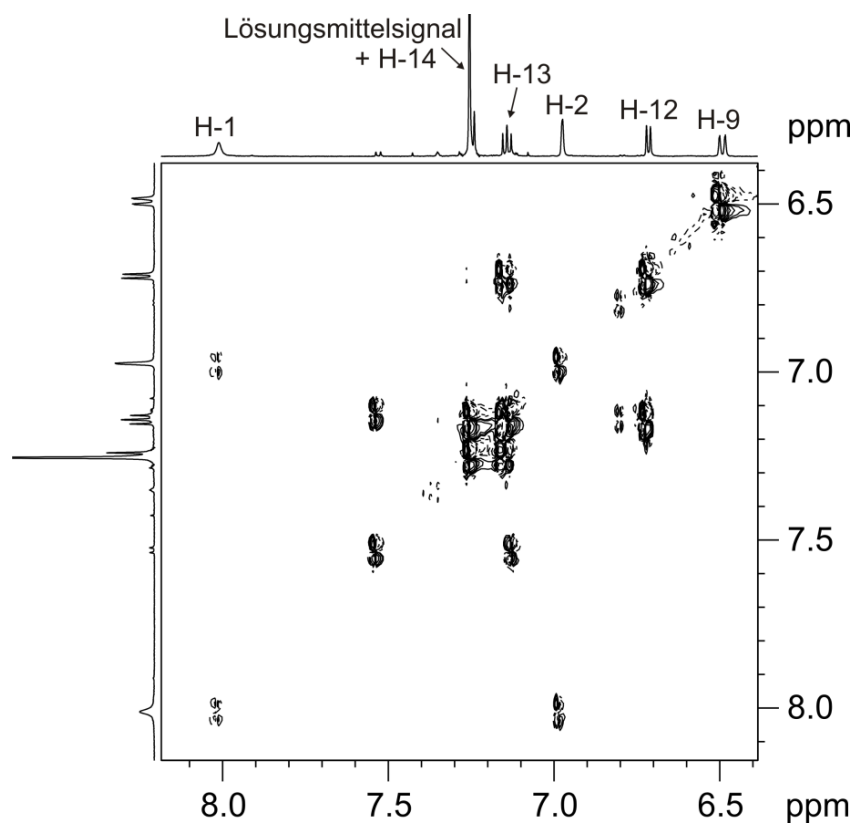


Abbildung 7-41: Vergrößerung des aromatischen Bereichs des DQF-COSY-Spektrums von Chanoclavin-I-Aldehyd in CDCl_3 .

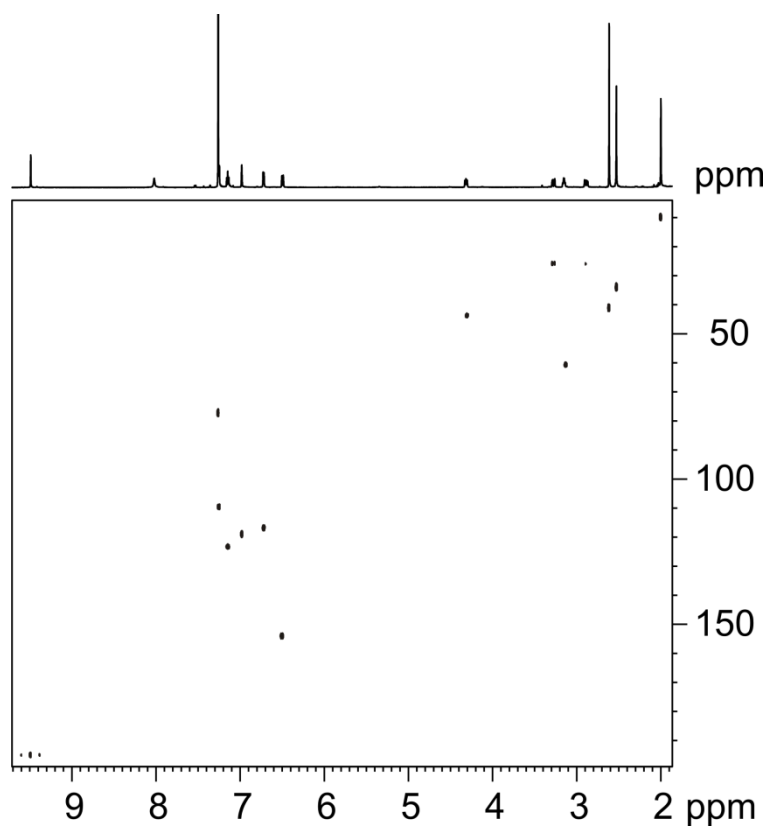


Abbildung 7-42: HSQC-Spektrum von Chanoclavin-I-Aldehyd in CDCl_3 .

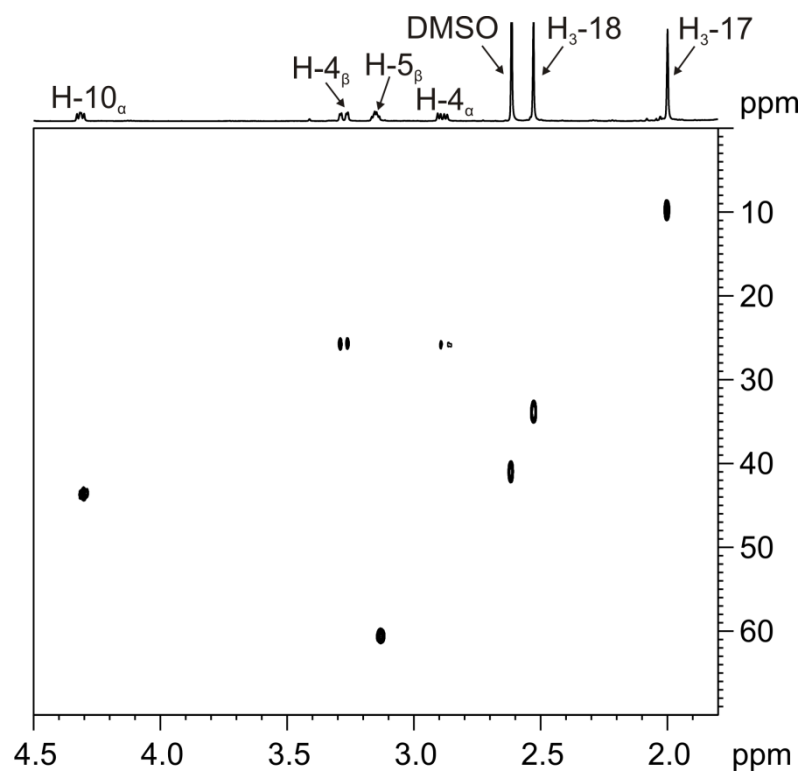


Abbildung 7-43: Vergrößerung des aliphatischen Bereichs des HSQC-Spektrums von Chanoclavin-I-Aldehyd in CDCl_3 .

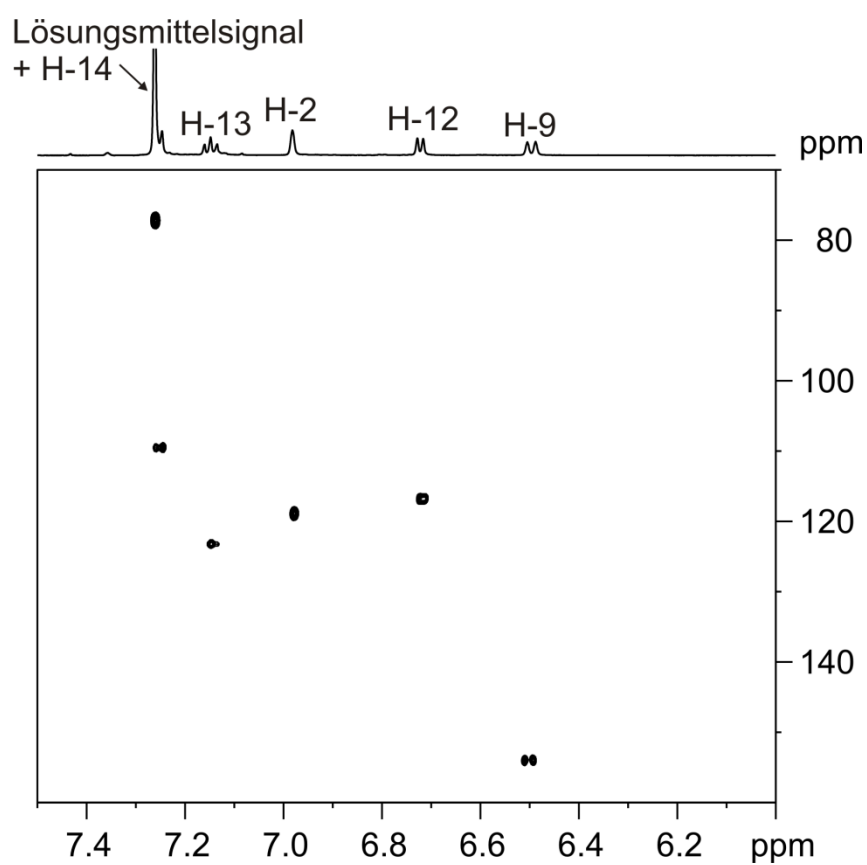


Abbildung 7-44: Vergrößerung des aromatischen Bereichs des HSQC-Spektrums von Chanoclavin-I-Aldehyd in CDCl_3 .

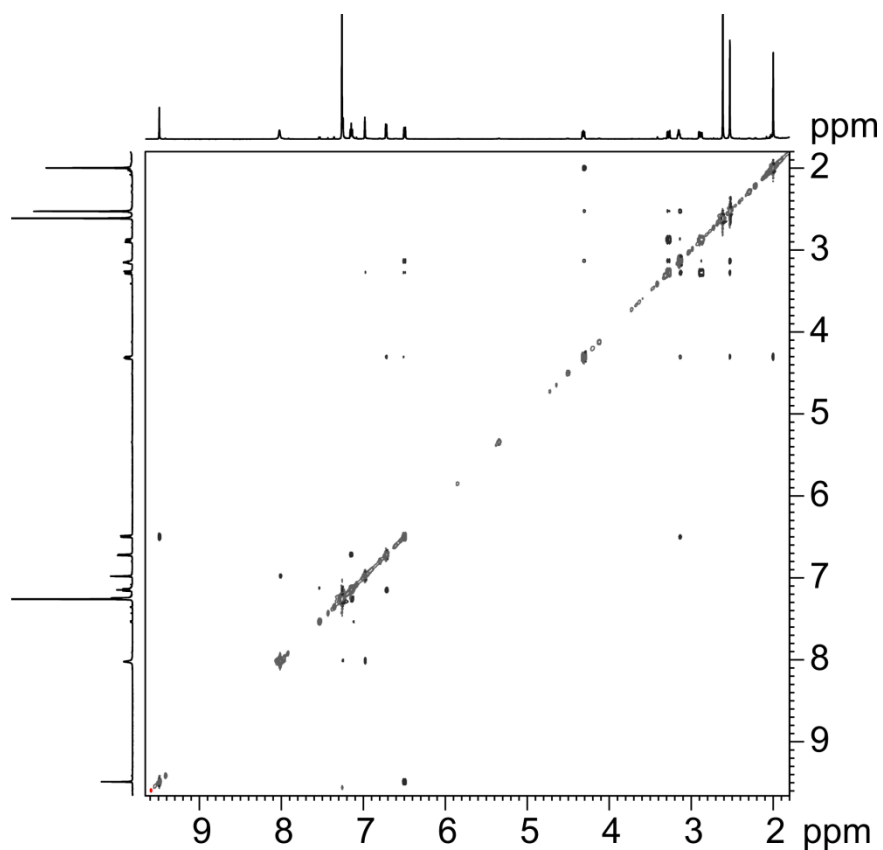


Abbildung 7-45: NOESY-Spektrum von Chanoclavin-I-Aldehyd in CDCl_3 .

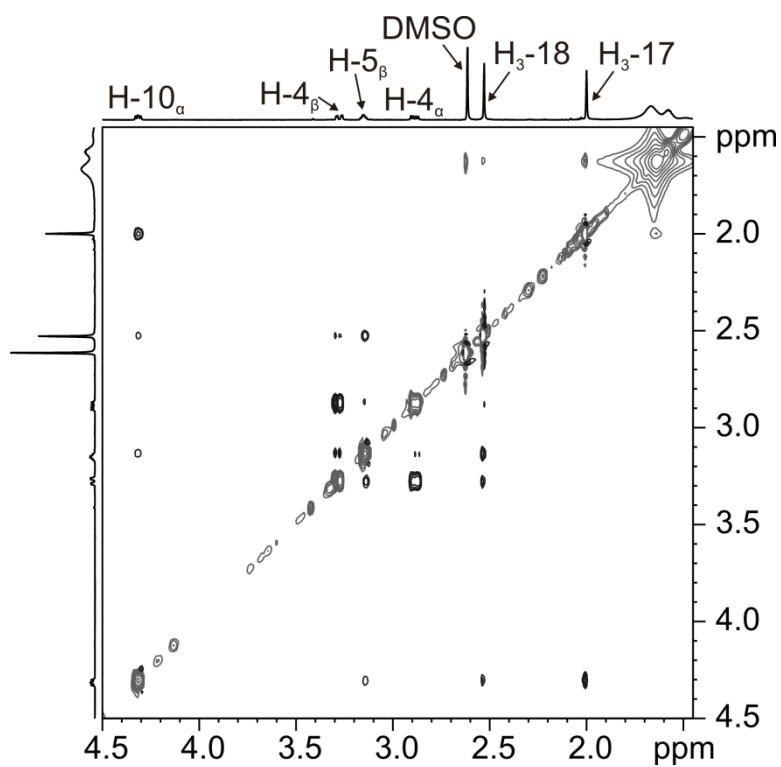


Abbildung 7-46: Vergrößerung des aliphatischen Bereichs des NOESY-Spektrums von Chanoclavin-I-Aldehyd in CDCl_3 .

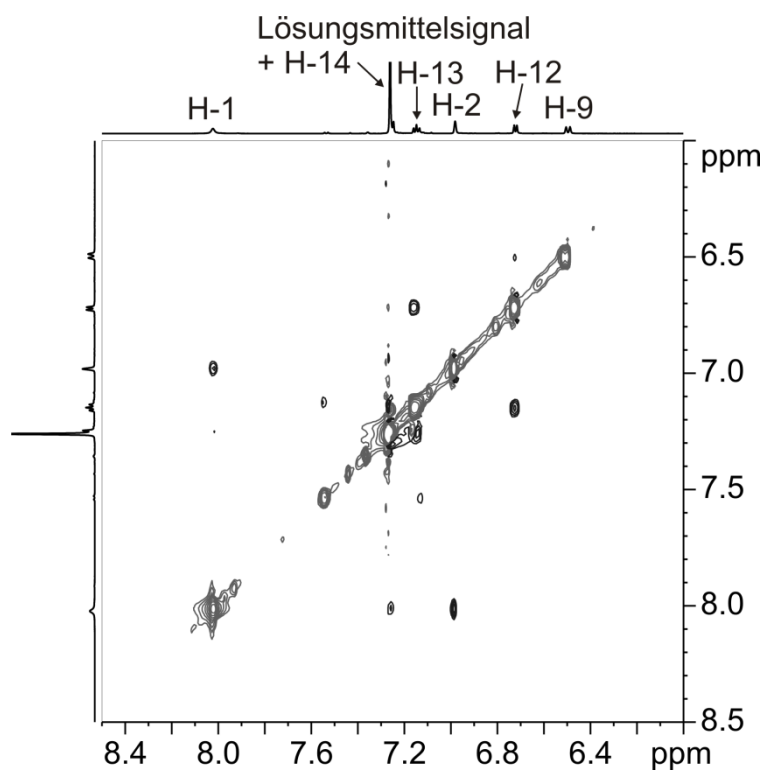


Abbildung 7-47: Vergrößerung des aromatischen Bereichs des NOESY-Spektrums von Chanoclavin-I-Aldehyd in CDCl_3 .

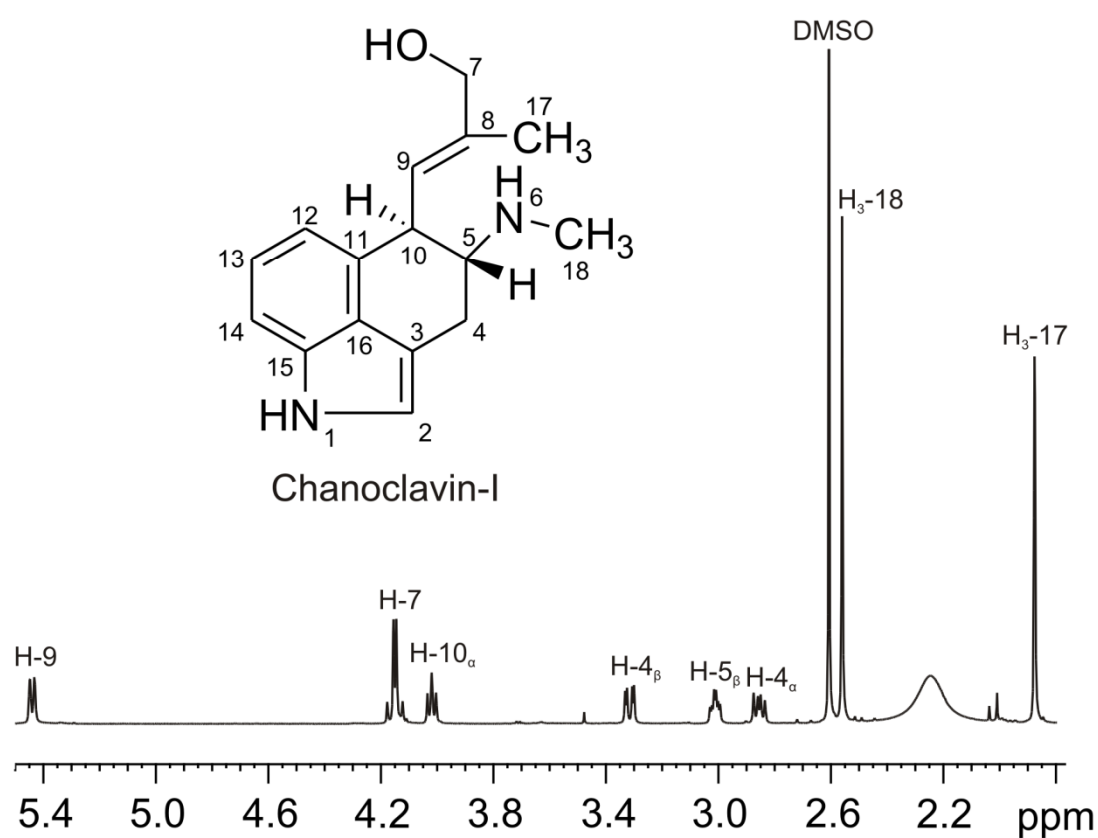
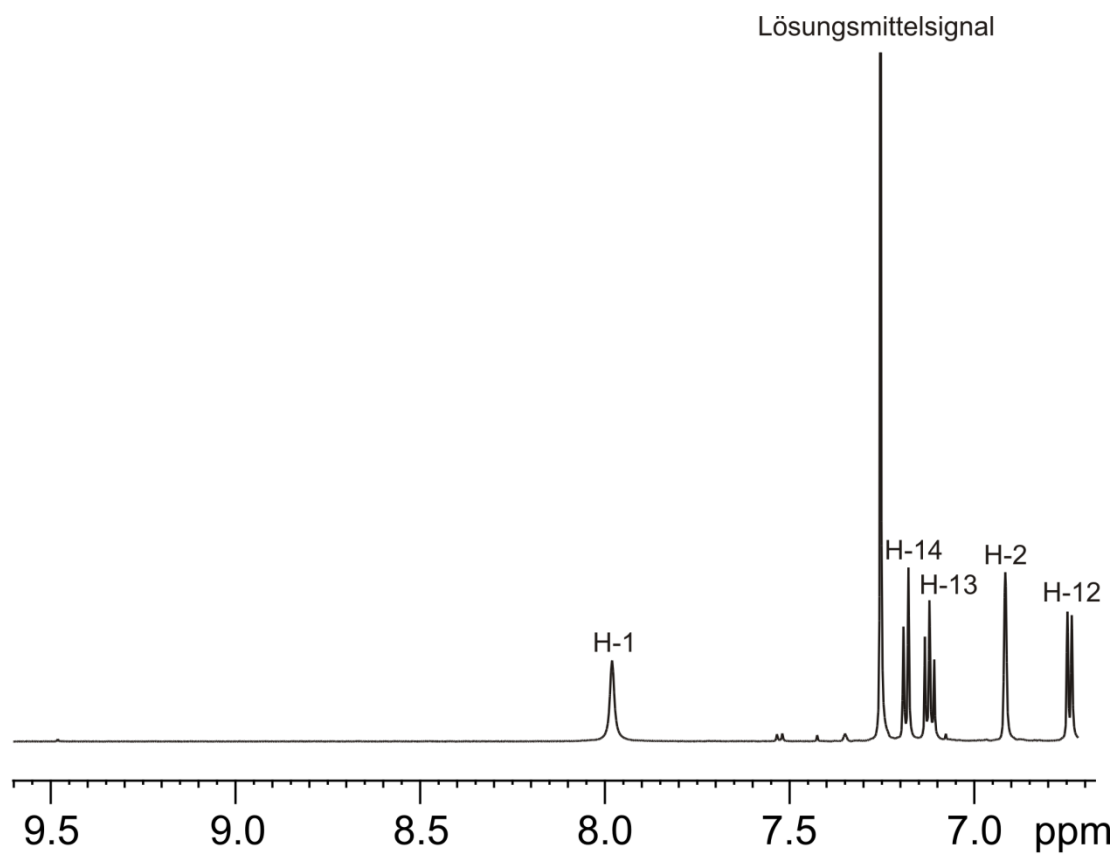


Abbildung 7-48: ¹H-NMR-Spektrum von Chanoclavin-I in CDCl₃, isoliert aus dem Reaktionsansatz mit ChaDH und deprotoniert mit Natriumcarbonat.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Shu-Ming Li für die hervorragende Betreuung und die Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Auch danke ich ihm dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, China kennenzulernen.

Prof. Dr. Michael Keusgen danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Kämpchen und Herr Newel danke ich für die Messung von ^1H -NMR- und COSY-Spektren und Dr. Steinbach, Dr. Laufenberg, Frau Zitzer und Frau Lang-Henkel danke ich für die Durchführung massenspektrometrischer Messungen. Besonders danke ich auch Dr. Xiulan Xie dafür, dass sie ihre Zeit und auch Freizeit für die 2D-NMR-Messungen meiner Proben geopfert hat. Ohne diese Spektren hätte ich manche Struktur nicht aufklären können.

Prof. Leistner danke ich für die Bereitstellung von Chanoclavin-I, unserem wichtigsten Substrat.

Bei Prof. Axel A. Brakhage und seinem Doktorand Christoph Heddergott (Leibniz-Institut für Naturstoffforschung und Infektionsbiologie - Hans Knöll Institut, Jena) möchte ich mich für die kooperative und lohnende Zusammenarbeit gegen Ende meiner Arbeit bedanken, die zu einer weiteren Publikation beigetragen hat.

Ein Dank geht auch an meine aktuellen und ehemaligen Institutskollegen Aili, Alex, Anika, Anne, Beate, Carsten, Daniel, Edyta, Kathrin, Kirsten, Lena, Mike, Nici, Ole, Peter, Soheil, Stefan, Sylwia, Viola, Wen-Bing und Xia.

Thanks Huixi for showing us your hometown Wenzhou. It was a great time even if it was short.

Meinem Freund Marco, der gleichzeitig auch mein Kollege und Schreibtischnachbar war, danke ich von ganzem Herzen für sämtliche positive und negative Kritik an meiner Arbeit, die hilfreichen Diskussionen und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Danke, dass du jederzeit für mich da bist!

Abschließend möchte ich meiner Familie, meinen Eltern und meiner Schwester, für ihre liebevolle Unterstützung und Förderung sowie ihre Geduld während dieser Zeit herzlich danken. Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für das kritische Korrekturlesen meiner Arbeit!

Curriculum vitae

Christiane Wallwey

Persönliche Daten

Geburtstag/-ort	20. Juni 1984 in Dortmund
Nationalität	Deutsch
Adresse	Rimbergstraße 1 35094 Lahntal, Deutschland
Telefon	0178-1984206
e-mail	christiane.wallwey@staff.uni-marburg.de

Ausbildung, Lehrtätigkeit und Forschungsaufenthalte

1990 bis 1994	Grundschule Liedbachschule, Unna-Billmerich
1994 bis 2003	Ernst-Barlach-Gymnasium, Unna, Allgemeine Hochschulreife
10/2003 bis 10/2006	Bachelorstudium der Biochemie, Schwerpunkt „Proteine - Struktur und biologische Funktion“, Ruhr-Universität Bochum
10/2006 bis 09/2008	Masterstudium der Biochemie, Schwerpunkt „Molekulare Medizin“, Ruhr-Universität Bochum
11/2008 bis heute	Promotion, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Pharmazie, Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie
04/2009 bis 03/2012	Betreuung des Phytopharmazeutischen Praktikums für Pharmaziestudenten im 6. Semester
09/2010	Forschungsaufenthalt in China <ul style="list-style-type: none">– Department of Food Science and Technology, Zhejiang University, Hangzhou– The Research Centre of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of TCM, Guangzhou